

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

**Filipa Alexandra Pereira Rosa Varela**

Tipificação de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC e  
detecção da sua aderência a células epiteliais pulmonares

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientador:**

Doutor João Inácio Silva (LNIV/INRB, I. P.)

**Co-orientadores:**

Doutora Ana Botelho (LNIV/INRB, I.P.)

Dra. Ivone Correia (LNIV/INRB, I.P.)

**LISBOA**

**2010**

**nº de arquivo**

**“Copyright”**

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

**Filipa Alexandra Pereira Rosa Varela**

Tipificação de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC e  
detecção da sua aderência a células epiteliais pulmonares

*Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre  
em Genética Molecular e Biomedicina, pela Universidade  
Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia*

**Orientador:**

Doutor João Inácio Silva (LNIV/INRB, I. P.)

**Co-orientadores:**

Doutora Ana Botelho (LNIV/INRB, I.P.)

Dra. Ivone Correia (LNIV/INRB, I.P.)

**LISBOA**

**2010**

O trabalho experimental descrito nesta dissertação foi desenvolvido nos Laboratórios de Bacteriologia e de Biologia Celular do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária – Instituto Nacional dos Recursos Biológicos, I. P. (LNIV/INRB, I.P.)

## **Agradecimentos**

Muitos caminhos se cruzaram com o meu nesta etapa da vida, alguns ramificaram em sentidos diferentes, outros caminharam e continuam a caminhar ao meu lado. Porém, todos foram importantes para alcançar o final desta jornada, e assim vos dirijo um “Muito Obrigada”.

Em primeiro lugar, o meu grato agradecimento ao Doutor João Inácio pela coordenação de excelência prestada durante toda a realização prática deste trabalho de mestrado, pela sua atitude entusiástica que contagia o ambiente envolvente e nos motiva constantemente, mesmo quando as coisas não correm como o esperado.

Também congratulo as minhas co-orientadoras de mestrado, Doutora Ana Botelho e Dra. Ivone Correia, pelo apoio e disponibilidade prestados durante a realização das actividades experimentais e durante a minha permanência no LNIV/INRB, I.P.

Aos meus colegas de laboratório agradeço o apoio, amizade e companheirismo durante toda a estadia no LNIV/INRB, I.P., e que perdurará, decerto, para lá da instituição. O mesmo remeto aos funcionários técnicos e investigadores desta instituição pela simpatia, interesse demonstrado e a hospitalidade calorosa com que me receberam.

Um especial agradecimento à Joana Pestana pela ajuda dedicada durante a realização de toda a segunda parte experimental sobre a técnica de FISH, pelas noitadas de trabalho e pelos desabafos ao fim de um dia de trabalho.

Um especial agradecimento a todos os meus amigos pelos momentos de distração e, apesar da distância que me separava de alguns, nunca deixaram de se preocupar e prestar o seu incentivo.

Para finalizar, e como não poderia deixar de ser, um profundo OBRIGADA aos meus pais pela confiança e apoio incondicional em todas as escolhas que fiz e continuo a fazer, pela compreensão e tolerância, não só nesta etapa, mas durante toda a caminhada percorrida até hoje.



## Sumário

A Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) é uma doença respiratória infecciosa, de grande relevo no âmbito da produção de gado bovino, causada pela bactéria *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*). Actualmente, a PPCB permanece endémica apenas em África, sendo aí responsável por perdas incontornáveis no sector pecuário. O último surto de PPCB detectado na Europa ocorreu em Portugal em 1999 mas, devido à sua natureza insidiosa, o risco de re-emergência é permanente. As estirpes de *MmmSC* associadas aos últimos surtos europeus de PPCB são tradicionalmente consideradas geneticamente muito homogéneas. No entanto, trabalhos recentes de tipificação molecular revelaram a existência de uma variabilidade genética intraspecífica superior ao que se esperava. A realização deste trabalho teve como base dois objectivos fundamentais: a tipificação de estirpes de *MmmSC* isoladas durante os últimos surtos de PPCB que ocorreram em Portugal entre 1993 e 1998, e a aplicação de um método alternativo e inovador para a detecção e quantificação de *MmmSC*, após a infecção de culturas celulares. Para a concretização do primeiro objectivo foi realizada uma análise da variabilidade polimórfica de três regiões VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) existentes no genoma de estirpes de *MmmSC*. O locus VNTR4 comprovou ser o mais polimórfico, detectando-se quatro perfis distintos entre as estirpes portuguesas. O perfil VNTR4 do tipo “9” (numerado em função das repetições da sequência de consenso) revelou-se amplamente distribuído geograficamente e foi predominante entre os isolados. No entanto, observou-se uma segregação geográfica de perfis, dado que na região da Beira Litoral apenas foram encontradas estirpes com o perfil VNTR4 do tipo “8”. Estes resultados sugerem que podem ter ocorrido, pelo menos, dois eventos de re-emergência de PPCB em Portugal, entre 1993 e 1998. Para a realização do segundo objectivo deste trabalho foi optimizada uma técnica baseada na hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes (FISH) que permitiu visualizar micoplasmas aderidos a culturas celulares. Esta técnica, que nunca tinha sido usada previamente na detecção de *MmmSC*, comprovou ser adequada para futuras aplicações em estudos de citoaderência e para a detecção de micoplasmas em culturas celulares.

**Palavras-chave:** Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*)





## ***Abstract***

The contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) is an infectious respiratory disease of great importance in the cattle production industry, caused by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*). Currently, CBPP remains endemic in Africa, where it is responsible for important losses in the livestock sector. The last outbreak of CBPP in Europe occurred in Portugal in 1999 but, due to its insidious nature, the risk of re-emergence of this disease is permanent. *MmmSC* strains associated with the recent CBPP outbreaks in Europe have been considered genetically very homogeneous. However, recent molecular typing studies revealed the existence of an intraspecific genetic variability higher than originally expected. This work was based on two fundamental objectives: the typing of *MmmSC* strains isolated during the last CBPP outbreaks that occurred in Portugal between 1993 and 1998, and the implementation of an alternative and innovative method for the detection and quantification of *MmmSC* after infection of cell cultures. To achieve the first objective we analysed the variability of polymorphic VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) regions existing in the genome of *MmmSC* strains. The *locus* VNTR4 proved to be the most polymorphic, presenting four distinct profiles among the Portuguese strains. The type "9" VNTR4 profile (called according to the number of repetitions of the consensus sequence) proved to be widely distributed and was predominant among the isolates. However, there was a geographical segregation of profiles, since all strains found in the region of Beira Litoral presented a type "8" VNTR profile. These results suggest that at least two CBPP re-emergence events may have occurred in Portugal between 1993 and 1998. To achieve the second objective, a fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) technique was optimized that allowed the direct visualization of mycoplasmas adherent to cell cultures. This technique, which has never been applied previously for the detection of *MmmSC*, proved to be adequate for future applications in cytoadherence studies and for the detection of mycoplasmas in cell cultures.

**Keywords:** Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP), *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*)



## Lista de abreviaturas

<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (do Inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleótidos
<b>EBL</b>	Células epiteliares de pulmão de embrião bovino (do Inglês <i>Embryonic bovine lung</i> )
<b>ELISA</b>	Ensaio de imuno-adsorção com enzimas imobilizadas (do Inglês <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
<b>FISH</b>	Hibridação <i>in situ</i> com sondas de DNA fluorescentes (do Inglês <i>Fluorescence in situ hybridisation</i> )
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogénio
<b>IS</b>	Sequência de inserção (do Inglês <i>Insertion sequence</i> )
<b>LNIV</b>	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
<b>M.</b>	<i>Mycoplasma</i>
<b>Mcc</b>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
<b>Mccp</b>	<i>Mycoplasma capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>
<b>MEM</b>	Meio essencial mínimo de Eagle
<b>MLSA</b>	Análise de sequências multilocus (do Inglês <i>Multilocus sequence analysis</i> )
<b>Mmc</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>capri</i>
<b>MmmLC</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> biotipo “large colony”
<b>MmmSC</b>	<i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> biotipo “small colony”
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção
<b>MTT</b>	Metil Trifenil Tetrazólio
<b>OIE</b>	Organização Internacional de Saúde Animal (do Francês <i>Office International des Epizooties</i> )
<b>ORF</b>	Grelha de leitura aberta (do Inglês <i>Open Reading Frame</i> )
<b>PAF</b>	Paraformaldeído
<b>p/v</b>	Peso/Volume
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino (do Inglês <i>Phosphate buffered saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacção de cadeia em polimerase (do Inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PCR-REA</b>	Análise de restrição dos produtos de PCR (do Inglês <i>Restriction Endonuclease Analysis of PCR</i> )
<b>PPCB</b>	Peripneumonia Contagiosa Bovina
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribossómico (do Inglês <i>Ribosomal ribonucleic acid</i> )
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino

<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colónias
<b>VNTR</b>	Número variável de repetições em tandem (do Inglês <i>Variable Number of Tandem Repeats</i> )

## Índice de matérias

Agradecimentos .....	i
Sumário .....	iii
<i>Abstract</i> .....	v
Lista de abreviaturas .....	vii
Índice de matérias .....	ix

## Capítulo I

### I. Introdução geral

I.1. Características gerais das bactérias da classe Mollicutes .....	1
I.2. Factores de patogenicidade dos micoplasmas .....	4
I.3. O complexo de espécies <i>Mycoplasma mycoides</i> .....	7
I.4. Peripneumonia Contagiosa Bovina .....	8
I.5. Características da espécie <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC .....	12
I.6. Mecanismos de patogenicidade em <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC .....	16
I.7. Biogeografia de <i>Mycoplasma mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC .....	19
I.8. Objectivos do trabalho e plano da dissertação .....	21

## Capítulo II

### II. Variabilidade genética intraspecífica de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

II.1. Introdução .....	23
II.2. Materiais e métodos .....	25
II.2.1. Estirpes analisadas .....	25
II.2.2. Condições de cultura .....	25
II.2.3. Testes bioquímicos .....	25
II.2.4. Extracção de DNA .....	27
II.2.5. PCR-REA da região CAP-21 .....	27
II.2.6. Obtenção de perfis de VNTR .....	28
II.2.7. Análise <i>in silico</i> de sequências nucleotídicas de DNA .....	29
II.2.8. Análise estatística .....	29
II.3. Resultados e discussão .....	30

## Capítulo III

### III. Aplicação da técnica FISH para detectar micoplasmas aderentes a células eucariotas

III.1. Introdução .....	43
III.2. Materiais e métodos .....	46
III.2.1. Estirpe analisada .....	46
III.2.2. Determinação da curva de crescimento de <i>MmmSC</i> .....	46
III.2.3. Cultura de células EBL .....	47
III.2.4. Experiência de citoaderência .....	49
III.2.5. Hibridação <i>in situ</i> com sondas de DNA fluorescentes .....	50
III.3. Resultados e discussão .....	52

## Capítulo IV

### IV. Considerações finais e perspectivas de trabalho futuro .....

57

### Referências bibliográficas .....

61

### Anexo .....

71

Do trabalho desenvolvido resultaram as seguintes publicações:

*Revistas científicas internacionais com arbitragem científica*

- **Varela, F., Inácio, J., Botelho, A. 2010.** Molecular diversity assessed by VNTR and IS1296 typing of historical *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains. Veterinary Microbiology (doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.030)

*Encontros científicos nacionais e internacionais*

- **Varela, F., Inácio, J., Botelho, A. 2010.** Análise de VNTR no estudo epidemiológico de doenças infecciosas animais: avaliação retrospectiva da Peripneumonia Contagiosa Bovina em Portugal. Primeiras Jornadas de Saúde Pública Veterinária da UTAD, Vila Real (29 de Maio, Poster)
- **Varela, F., Inácio, J., Botelho, A. 2010.** VNTR analysis in the epidemiological study of infectious animal diseases: a retrospective evaluation of CBPP in Portugal. Second Global Conference of OIE Reference Laboratories and Collaborating Centers, Paris, França (21 - 23 de Junho, Folheto)

## Introdução geral

### I.1. Características gerais das bactérias da classe Mollicutes

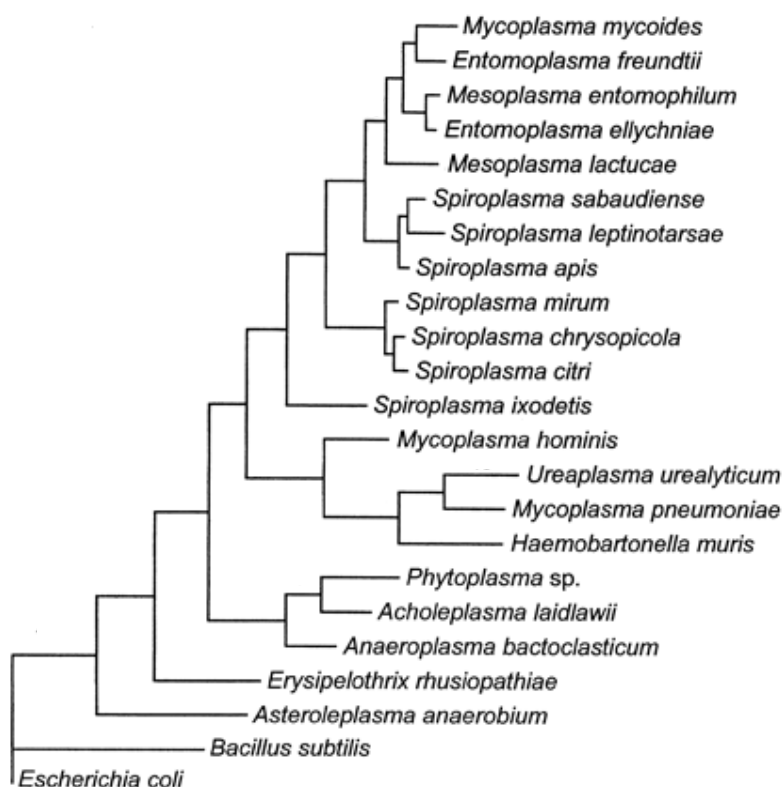
As primeiras bactérias desprovidas de parede celular foram descritas há mais de 100 anos mas, devido às suas características controversas, permaneceram catalogadas como vírus até quase ao início da Segunda Guerra Mundial. Apenas em 1930 estes microrganismos foram de facto considerados bactérias (Dybvig e Voelker, 1996), classificados na classe Mollicutes (*mollis*- leve, *cútis*- pele). O termo micoplasma é assim trivialmente aplicado a qualquer bactéria pertencente à classe Mollicutes, sendo o género *Mycoplasma* dos mais relevantes deste grupo. Os micoplasmas são das células mais pequenas do mundo vivo, relativamente simples, com capacidades auto-replicativas e com uma morfologia extremamente pleomórfica (Figura 1.1), fruto da ausência de parede celular. Por este motivo, são também resistentes aos antibióticos do grupo dos *beta*-lactâmicos que actuam sobre a biossíntese do peptidoglicano, como por exemplo a penicilina. Apesar da sua aparente fragilidade, estas bactérias actuam geralmente como parasitas, colonizando um vasto leque de hospedeiros animais, incluindo mamíferos, aves, répteis, artrópodes e peixes, e plantas.



**Figura 1.1.** Imagem de microscopia electrónica de células de *Mycoplasma pneumoniae* apresentando uma morfologia pleomórfica (adaptado de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).



A análise comparativa de sequências oligonucleotídicas, nomeadamente, dos genes que codificam para o 16S rRNA, tem tido um impacto generalizado nos estudos da filogenia e evolução bacterianas. Consequentemente, estes estudos têm também moldado a sistemática das bactérias da classe Mollicutes. Deste modo, apesar de desprovidos de parede celular, é reconhecido que os micoplasmas estão filogeneticamente relacionados com as bactérias Gram positivas com baixo teor em guanina e citosina. Adicionalmente, a análise filogenética das sequências que codificam para o gene do 16S rRNA permitiu subdividir as espécies de micoplasmas em vários grupos e géneros distintos (Figura 1.2). Entre os micoplasmas mais relevantes encontram-se as espécies dos géneros *Acholeplasma*, *Mycoplasma*, *Spiroplasma* e *Ureaplasma*.



**Figura 1.2.** Árvore filogenética de algumas espécies pertencentes à classe Mollicutes (utilizando as espécies *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* como raiz), baseada na análise de sequências do gene que codifica para o 16S rRNA (Adaptado de Gasparich et al., 2004)

É de realçar, no entanto, que as análises filogenéticas baseadas num único gene podem fornecer uma informação limitada sobre as relações e história evolutiva das espécies

bacterianas (Fox *et al.*, 1992; Oshima e Nishida, 2007). Estratégias mais recentes envolvem a realização de análises filogenéticas baseadas em sequências mais extensas, e até totais, dos genomas bacterianos, tornadas possíveis com o aumento exponencial, nos últimos anos, de sequências de DNA depositadas em bases de dados públicas. Este tipo de análise já foi realizado com algumas espécies de micoplasmas, incluindo as pertencentes ao género *Mycoplasma* (Oshima e Nishida, 2007). Neste estudo foi evidenciada a existência de três grandes grupos de micoplasmas, com base na análise comparativa de 143 famílias de genes ortólogos: grupo *M. hyopneumoniae*, grupo *M. mycoides*, grupo *M. pneumoniae*. Contudo, a análise filogenética dos genes que codificam para o RNA ribossomal dos micoplasmas é considerada também bastante fiável, uma vez que estes genes estão menos envolvidos em fenómenos de transferência horizontal de genes (muito frequentes nestas bactérias) (Jomantiene *et al.*, 1998; Oshima e Nishida, 2007).

Em termos de características genotípicas gerais, os micoplasmas apresentam genomas de tamanho bastante reduzido, inferior a 600 kb em algumas espécies, com uma elevada percentagem de conteúdo em adenina e timina. Outro aspecto invulgar relaciona-se com a tradução do codão TGA no aminoácido triptofano na maioria das espécies de micoplasmas, enquanto este corresponde ao codão *stop* no código genético universal (Dybvig e Voelker, 1996). Estes organismos são desprovidos de muitos genes e, consequentemente, carecem de muitas vias enzimáticas básicas, como por exemplo a via para a produção da parede celular, a via para a biossíntese de purinas, o ciclo do ácido tricarboxílico e o sistema de cadeia de transporte de electrões mediado por citocromos, entre outros. Os micoplasmas possuem um cromossoma circular de DNA em cadeia dupla, com muitos elementos de DNA repetidos ao longo do mesmo. Supõe-se que a maioria desses elementos corresponde a sequências de inserção (IS) (Dybvig e Voelker, 1996). Entre as sequências de inserção mais bem estudadas encontram-se a IS1221 (nas espécies *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma hyopneumoniae*) e a IS1296 (na subespécie *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC - *MmmSC*) (Dybvig e Voelker, 1996). Contudo, alguns dos elementos de DNA repetidos no genoma dos micoplasmas não estão relacionados com sequências de inserção mas sim com genes que codificam antigénios de superfície, cuja recombinação poderá também contribuir para a variação antigénica nestas espécies.

A presença de elementos de DNA extra-cromossómicos é rara nos micoplasmas, excepto nas espécies de *Spiroplasma*. No entanto, já foram encontradas formas replicativas de genomas

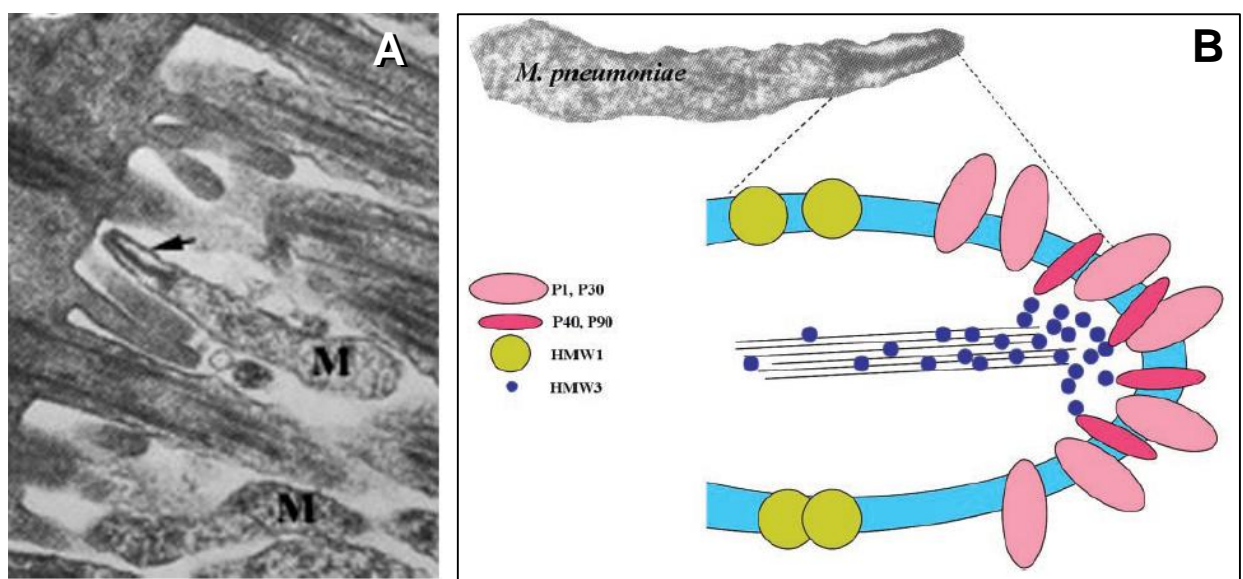
virais (fagos) em algumas espécies de *Acholeplasma* e *Mycoplasma*, como por exemplo o isolamento do fago lisogénico MAV1 em *Mycoplasma arthritidis*. A ocorrência de plasmídeos nos micoplasmas também já foi identificada, porém com menor frequência. Estes plasmídeos foram, até à data, descobertos apenas nas espécies *Spiroplasma citri* e *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Nesta última espécie, os plasmídeos pADB201 e pKMK1 são relativamente pequenos (de tamanho inferior a 2 Kb) e contêm somente factores necessários à sua autoreplicação e manutenção (Dybvig e Voelker, 1996).

Apesar das suas capacidades metabólicas relativamente limitadas, os micoplasmas possuem uma maquinaria metabólica suficiente para o crescimento celular, para a fuga às defesas imunitárias e, por vezes, para a sobrevivência no hospedeiro por períodos indefinidos. Algumas espécies são mesmo capazes de invadir as células eucariotas e, aparentemente, sobreviver intracelularmente. Vários estudos evidenciam um impacto crescente dos micoplasmas na emergência de doenças em animais, incluindo no Homem, e plantas. Os determinantes de virulência destas bactérias são incrivelmente complexos e as suas propriedades biológicas únicas desafiam o hospedeiro de uma forma totalmente diferente em relação às bactérias patogénicas típicas. Os micoplasmas têm sido referidos como co-factores para a patogenicidade do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), para algumas transformações malignas, aberrações cromossómicas, síndrome da Guerra do Golfo, síndrome da fadiga crónica, doença de Crohn e artrite (Baseman e Tully, 1997).

## **I.2. Factores de patogenicidade dos micoplasmas**

Em contraste com outras bactérias patogénicas, em que a virulência é determinada principalmente pela produção de toxinas, citolisinas e invasinas, nenhum gene de virulência primário típico foi, até agora, encontrado no genoma das quinze espécies de micoplasmas cujo genoma total já está sequenciado (Fraser *et al.*, 1995; Pilo *et al.*, 2007; Westberg *et al.*, 2004). No entanto, e apesar de ainda pouco compreendida, a capacidade de fixação dos micoplasmas às células hospedeiras é considerada um dos seus principais factores de virulência. É de realçar que micoplasmas mutantes, deficientes na sua capacidade de aderência, são efectivamente avirulentos (Rottem e Naot, 1998). Também são conhecidas algumas estirpes de micoplasma que exibem um organelo terminal polarizado, que funciona como ponto de ancoragem às células hospedeiras (Figura 1.3A). Várias proteínas envolvidas na adesão, tais como a adesina P1 e proteínas acessórias desta, como as P30, P40, P90 e HMW3, foram descritas em *Mycoplasma pneumoniae* (agente causador da pneumonia atípica primária em

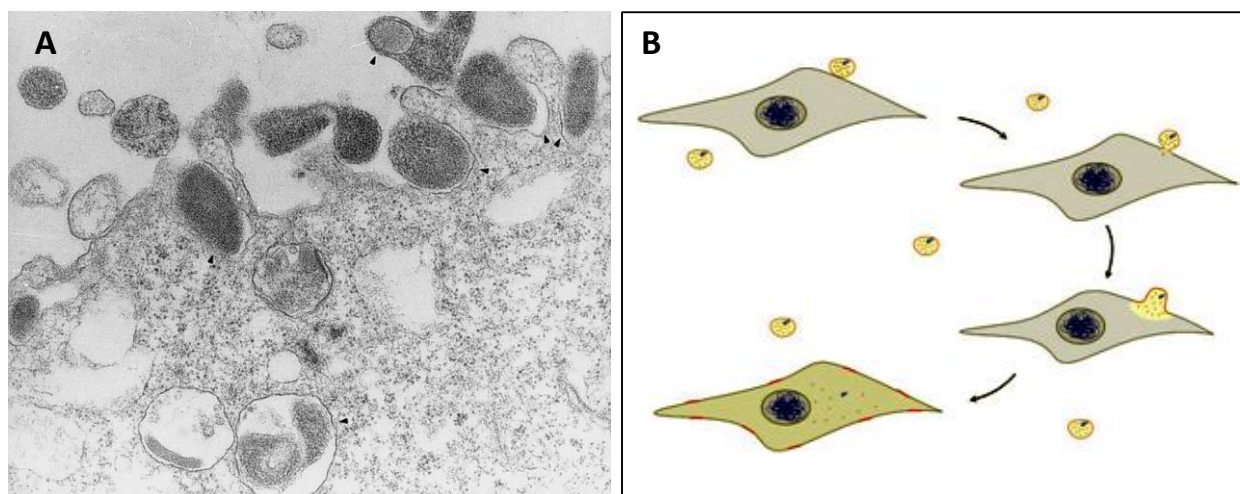
humanos) e localizam-se, aparentemente, neste organelo terminal (Figura 1.3B). Contudo, como atrás salientado, são relativamente desconhecidos os mecanismos de interacção das proteínas de adesão dos micoplasmas com os respectivos receptores, assentes nas membranas das células hospedeiras (as sialoglicoproteínas e os glicolípidos sulfatados são dois tipos de possíveis receptores). O organelo terminal pode também desempenhar um papel importante em termos de mobilidade, pois foi observada a sua orientação no sentido do movimento quando as células de espécies como *M. pneumoniae* e *M. genitalium*, entre outras, deslizam em superfícies lisas.



**Figura 1.3.** (A) Imagem de microscopia electrónica de transmissão de *Mycoplasma pneumoniae* “M” aderido a células mucosas ciliadas pelo organelo terminal (seta preta); (B) Esquema da localização da maioria das proteínas envolvidas na citoaderência de *M. pneumoniae* (Adaptado de Rottem, 2003)

Embora se considere que a maioria dos micoplasmas permanece ancorada à superfície das células hospedeiras, alguns resultados demonstram que existem espécies de *Mycoplasma* capazes de invadir e sobreviver dentro de células não-fagocíticas. Um exemplo dessa situação verifica-se com a espécie *Mycoplasma penetrans* em células HeLa (Figura 1.4A) e em células do tracto urogenital de pacientes humanos com SIDA (Rottem, 2003). Desta forma, a ausência de parede celular nestas bactérias permite o contacto directo entre a sua membrana e a da célula hospedeira. Em condições apropriadas, este contacto pode levar a um rearranjo do citoesqueleto da célula alvo e à fusão celular que, no entanto, é dependente do conteúdo em colesterol não esterificado da membrana plasmática do micoplasma (p.e. *Acholeplasma* spp.

não são fusogénicas porque o colesterol não esterificado não é um componente estrutural das suas membranas) (Figura 1.4B). A inserção de componentes membranares dos micoplasmas na membrana da célula hospedeira pode alterar locais de reconhecimento dos receptores, perturbar a indução e expressão de citocinas e alterar a comunicação entre as várias células do tecido afectado (Rottem e Naot, 1998). Por exemplo, a disrupção dos canais de potássio das células epiteliais brônquicas ciliadas, após fusão com células de *M. hyopneumoniae*, resulta em ciliostase (Rottem, 2003).



**Figura 1.4.** (A) Microfotografia electrónica de *Mycoplasma penetrans* inseridos em vesículas de células HeLa; (B) Diagrama esquemático da fusão de um micoplasma com uma célula eucariota (Adaptado de Rottem, 2003).

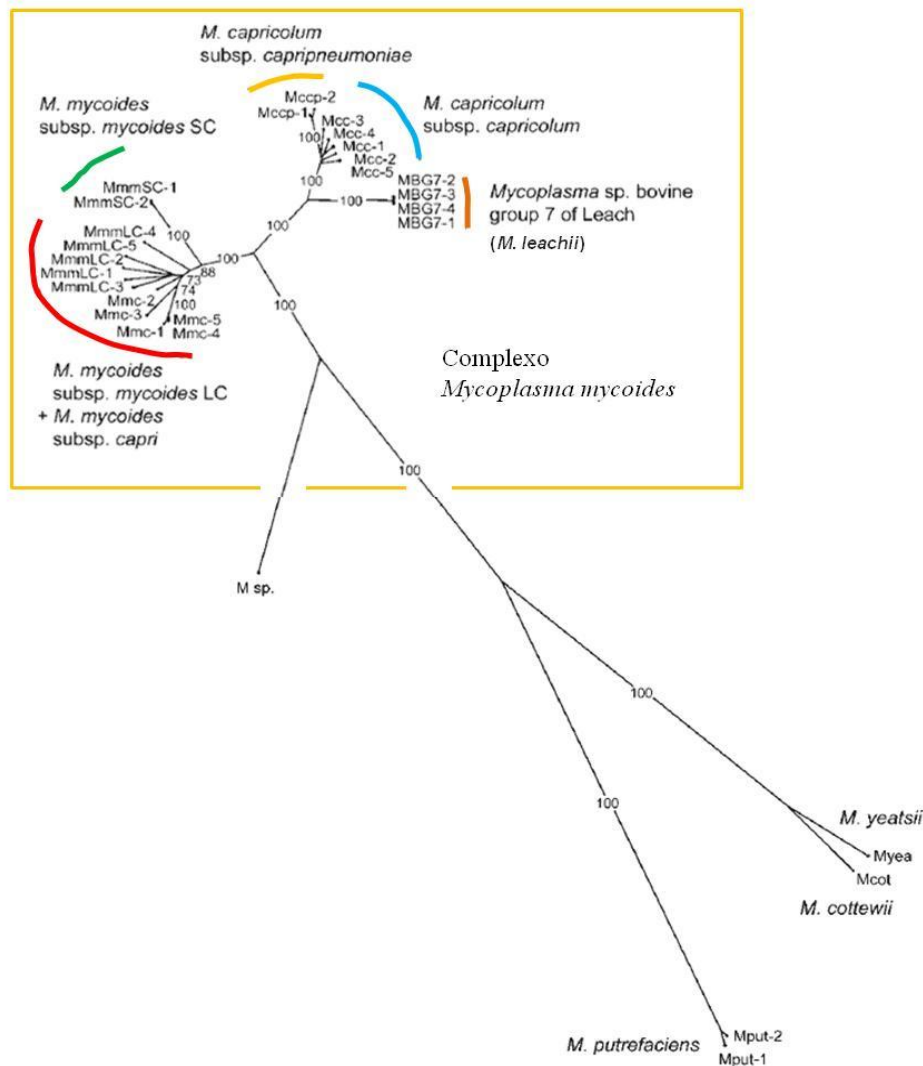
Outros determinantes de virulência relevantes em algumas espécies de micoplasmas são a produção de peróxido de hidrogénio e de radicais superóxido, a competição e depleção de nutrientes e de precursores biosintéticos (afectando a manutenção e o funcionamento da célula hospedeira), a secreção de enzimas citolíticas (p.e. fosfolipases, ATPases, hemolisinas, proteases e nucleases) e a residência intracelular (estabelecendo estados latentes ou crónicos e ludibriando os mecanismos imunitários e as terapias com drogas selectivas) (Baseman e Tully, 1997). É de realçar, por exemplo, que a competição dos micoplasmas não fermentadores por arginina pode levar rapidamente à supressão das reservas deste aminoácido, conduzindo à inibição da síntese de histonas nas células hospedeiras, causando aberrações cromossómicas, nomeadamente quebras, translocações, redução numérica e aparecimento de novas variedades cromossómicas.

Em suma, a espécie de micoplasma, o número de células patogénicas aderidas às células hospedeiras, o período de incubação, a indução de citocinas pró-inflamatórias, a idade e o sistema imunitário do hospedeiro, ditam a diversidade de patologias e a intensidade dos sintomas despontados pelos micoplasmas.

### **I.3. O complexo de espécies *Mycoplasma mycoides***

O complexo *Mycoplasma mycoides* inclui seis espécies patogénicas de ruminantes com graus variáveis de incidência e impacto económico (Figura 1.5). Incluem-se neste complexo as espécies/subespécies *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotipo “Large Colony” (*MmmLC*) e *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*), ambos agentes de pneumonias e artrites em pequenos ruminantes; *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (*Mcc*), que causa infeções pulmonares em cabras; *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*), responsável pela Peripneumonia Contagiosa Caprina (PPCC); *Mycoplasma* sp. “serogrupo bovino” 7 de *Leach* (MBG7), isolado a partir de bovinos e de cabras; e *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotipo “Small Colony” (*MmmSC*). Recentemente, devido à sua identidade genética, a subespécie *MmmLC* foi reconhecida como pertencente à subespécie *Mmc* (Shahram *et al.*, 2010) e MBG7 foi formalmente classificada como *Mycoplasma leachii* (Manso-Silván *et al.*, 2009).

A espécie do complexo *Mycoplasma mycoides* mais importante, pela gravidade e impacto económico da doença animal de que é responsável, é *M. mycoides* subsp. *mycoides* biotipo “Small Colony”, responsável pela Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB).

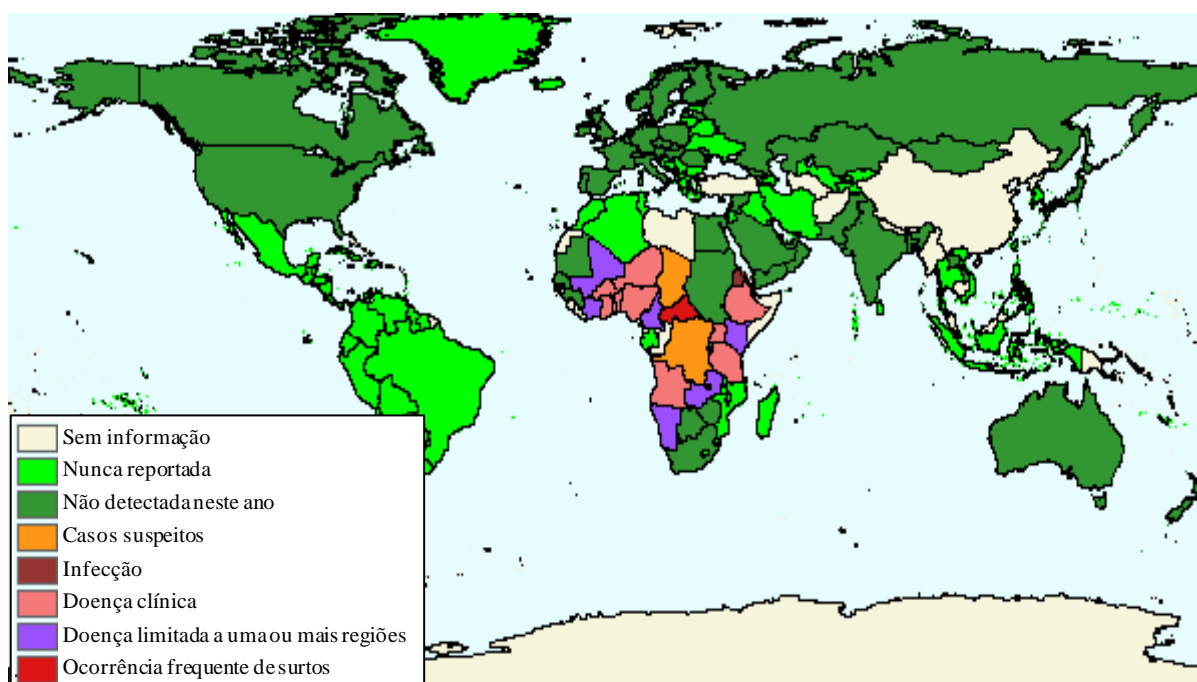


**Figura 1.5.** Árvore filogenética incluindo espécies representantes do complexo *Mycoplasma mycoides* e outras espécies próximas (baseada na análise da sequência nucleotídica de cinco genes) (Adaptado de Manso-Silván *et al.*, 2007)

#### I.4. Peripneumonia Contagiosa Bovina

A Peripneumonia Contagiosa Bovina (PPCB) que, como já foi mencionado atrás, possui a bactéria *MmmSC* como agente etiológico, é uma doença respiratória infecciosa de grande relevo e impacto sócio-económico, principalmente em países subdesenvolvidos (Pilo *et al.*, 2007). Afecta principalmente bovinos (*Bos taurus*), búfalos de água (*Bubalus bubalis*), zebus (*Bos indicus*) e, eventualmente, ovinos e caprinos. A PPCB foi a única enfermidade animal de origem bacteriana inserida na “Lista A” da OIE, que englobava as doenças infecciosas responsáveis pelas grandes ameaças à saúde animal. Até ao final do século XIX esta doença

foi prevalente na maioria dos continentes, sendo reconhecida nalgumas regiões da Europa desde o século XVI (Lorenzon *et al.*, 2003). A dispersão da PPCB pela Europa deveu-se ao crescente comércio de animais em meados do século XIX. A erradicação desta doença no continente Europeu, cujo último surto ocorreu em 1999 em Portugal, foi alcançada através de políticas de restrição na movimentação animal, impedimento da entrada de gado em áreas afectadas, quarentena e abates em massa (Lorenzon *et al.*, 2003; Pilo *et al.*, 2007; Thiaucourt *et al.*, 1998). Actualmente, a PPCB está confinada a algumas áreas da África subsariana (Figura 1.6), sendo aí responsável por grandes perdas na produção de gado e, consequentemente, efeitos sócio-económicos incontornáveis no comércio internacional de animais. A prevalência desta doença no continente asiático permanece pouco clara.



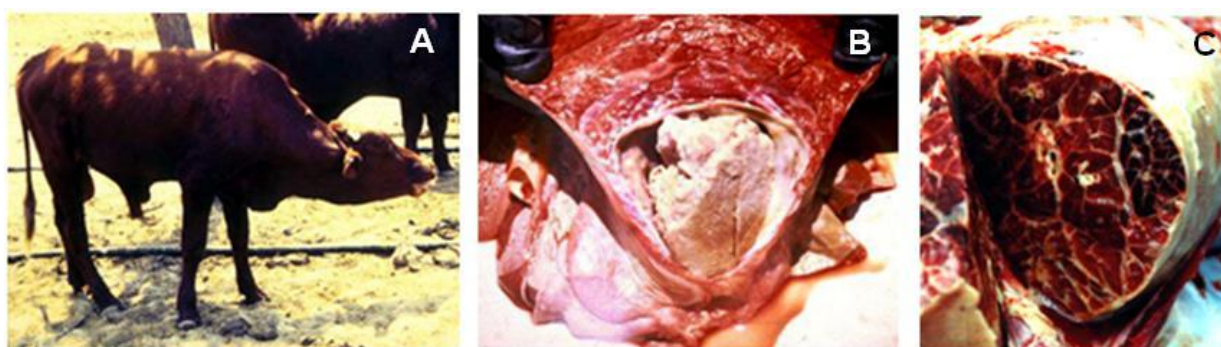
**Figura 1.6.** Distribuição global da peripneumonia contagiosa bovina em 2009 (*adaptado de [www.oie.int](http://www.oie.int)*)

A transmissão da PPCB ocorre principalmente por via aerógena, através da inalação de aerossóis expelidos pela tosse dos animais infectados. Mas também a saliva, as secreções mucosas, a urina e a infecção placentária podem constituir meios frequentes de transmissão. Desta forma, as principais fontes de infecção e disseminação da doença são os animais portadores assintomáticos. Após a infecção, a doença tem um espectro de manifestação muito variado englobando desde as formas agudas e hiperagudas até às variantes subagudas e



crônicas, estas últimas com um elevado risco de transmissão do agente infeccioso (Thiaucourt *et al.*, 1998). Na sua forma aguda, os sintomas e lesões mais frequentes de PPCB nos animais são a tosse muco-purulenta, dificuldades respiratórias, o cessar da ruminação, anorexia, indução de abortos, pleurisia com acumulação de líquido exsudativo na cavidade pleural, hepatização pulmonar que confere um aspecto marmoreado ao pulmão, pericardite, peritonites e edema interlobular (Figura 1.7A e C). A progressão da doença é rápida e a morte sucede-se em poucos dias por asfixia e/ou falha cardíaca (March, 2004). Os animais infectados com a forma crônica da doença são caracterizados pela existência de cápsulas de diferentes tamanhos num dos pulmões, compostas por material fibroso que circunda as áreas necróticas do parênquima pulmonar (sequestro) (Figura 1.7B). Esta fase crônica também pode ser caracterizada por lesões resolvidas na forma de cicatrizes fibrosas, mas que só são detectadas nos animais abatidos e que possuíam a infecção há pelo menos um ano (Thiaucourt *et al.*, 1998). A co-existência de sintomas pulmonares em adultos e artrite nos animais jovens deve ser considerada um alerta para a possibilidade de um caso de PPCB.

A identificação do tipo de lesão no matadouro também pode ajudar a clarificar a hipótese de PPCB. A quantidade de exsudado amarelo ou túrgido na cavidade pleural (acima dos 30 litros), o edema interlobular, o aspecto marmoreado de um dos pulmões e o sequestro com cápsula fibrosa circundando o tecido necrótico nos animais recuperados são aspectos a considerar (Figura 1.7BC).



**Figura 1.7.** (A) Caso clínico de PPCB de um animal com dificuldades respiratórias; (B) Sequestro pulmonar de um animal com PPCB crônica; (C) Aspecto marmoreado do pulmão de um animal infectado (*adaptado do Manual de Saúde Animal da OIE-FAO, 2002*)

Nos países em que existe um Plano de Erradicação, como foi o caso de Portugal até 2003, os animais de uma exploração são periodicamente sujeitos ao teste de rastreio obrigatório indicado pela OIE, o teste serológico de Fixação do Complemento (FC), que utiliza como material biológico o soro animal. O abate, por sua vez, só é concretizado se se verificar um resultado positivo para este teste de rastreio e se esse resultado for confirmado pelo teste de *immunoblotting* (Gonçalves *et al.*, 1998), ou se o animal apresentar sinais clínicos evidentes de PPCB. Após o abate do animal, o diagnóstico de confirmação de PPCB é feito através do isolamento e identificação do agente por testes culturais, bioquímicos e moleculares. Os testes podem ser feitos a partir de amostras de lesões pulmonares, fluido pleural, nódulos linfáticos e exsudado pulmonar.

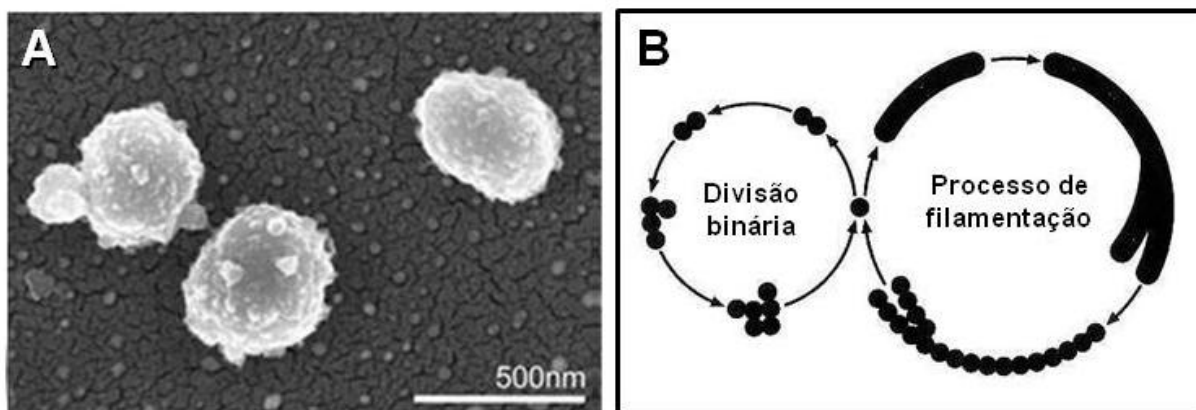
Actualmente, não existe uma terapia eficaz para tratar os animais infectados, sendo o uso de antibióticos oficialmente desencorajado. No entanto, estes compostos são bastante utilizados em várias regiões africanas, mascarando muitas vezes os sintomas que permitem ponderar um caso de PPCB. A profilaxia médica actual utilizada em muitos países Africanos baseia-se na aplicação de estirpes vacinais atenuadas de *MmmSC*. Actualmente são numerosas as estirpes vacinais utilizadas apesar de, na generalidade, apresentarem uma eficácia bastante limitada (sendo elas a T1 e a KH<sub>3</sub>J e os seus derivados - T1/44, T1sr e KH<sup>3</sup>Jsr, a T2, T3, F, Armara, DKI e a V5, esta última anteriormente usada com sucesso na Austrália). Entre as estirpes mais utilizadas em África encontram-se a T1/44 e a T1sr. A primeira foi obtida após 44 passagens da estirpe original T1 em ovos embrionários e a segunda por passagens consecutivas que originaram a variante T1sr, resistente à estreptomicina (Janis *et al.*, 2008). Contudo, os requisitos básicos para controlar a PPCB em África devem passar pela criação de testes de diagnóstico sensíveis, fáceis de executar e baratos, que consigam detectar o *MmmSC* não só em animais sintomáticos mas também em portadores assintomáticos, juntamente com estratégias de vacinação mais eficazes capazes de reduzir a carga infecciosa nas áreas afectadas (Pilo *et al.*, 2007). É de realçar que medidas de controlo como as que conduziram à erradicação da PPCB na Europa, nomeadamente em Portugal, baseadas na detecção e abate dos animais infectados, dificilmente poderão ser aplicadas no continente Africano devido às suas carências financeiras, à fragmentação ou ausência de serviços veterinários e aos movimentos nómadas do gado através das fronteiras.

Há ainda que realçar que as medidas de vigilância para a PPCB devem ser mantidas ininterruptamente, mesmo em regiões do globo onde a doença é considerada erradicada, pois

ocorreram vários surtos de PPCB no final do século XX em países do sul da Europa, tais como Espanha, Itália e Portugal, após longos períodos de ausência da doença. Isto demonstra a ameaça constante da PPCB sobre os países industrializados, colocando em causa a eficácia das respectivas campanhas de erradicação.

### I.5. Características da espécie *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

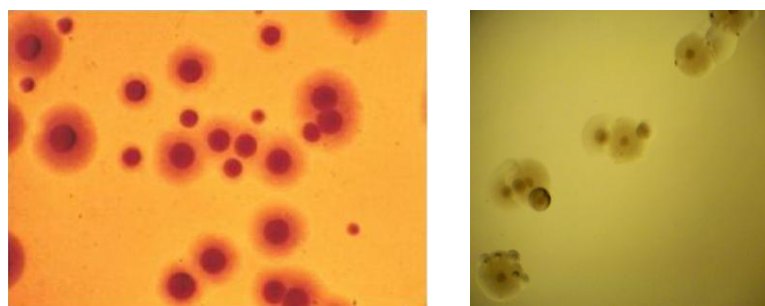
A análise por microscopia electrónica de varrimento mostrou que a morfologia celular de *Mmm*SC é relativamente esférica, de diâmetro variável entre 200 nm a 500 nm, e com uma superfície irregular e granular (Figura 1.8A). As células surgem, normalmente, na forma singular, mas a formação em pares ou em pequenos grupos também é possível (Bonvin-Klotz *et al.*, 2008). A divisão binária é a forma de reprodução dos micoplasmas, originando por vezes filamentos multinucleares semelhantes a estruturas miceliares, que podem atingir os 100 µm de comprimento e os 0,4 µm de espessura (Figura 1.8B). A etimologia da designação *Mycoplasma* advém justamente desta propriedade, em *myces*, que significa fungo, e *plasma*, com o significado de forma (i.e. forma de, ou semelhante a, um fungo) (Carvalho, 2008; Miyata e Seto, 1999).



**Figura 1.8.** (A) Microfotografia electrónica de varrimento da superfície celular de *Mmm*SC (*adaptado de Bonvin-Klotz et al.*, 2008); (B) Esquematisação do modo de reprodução dos micoplasmas (*adaptado de www.utmb.edu*)

Dado que estas bactérias não possuem parede celular, a membrana plasmática é a única barreira que as separa do ambiente envolvente sendo, portanto, os esteróis (p.e. colesterol) suplementos nutricionais fundamentais nos seus meios de crescimento (Carvalho, 2008; Nicholas e Bashiruddin, 1995). Muitos micoplasmas são considerados como microrganismos

fastidiosos. O *MmmSC* cresce relativamente bem em meios de cultura artificiais, requerendo no entanto suplementos específicos e selectivos, tais como o soro sanguíneo inactivado (p.e. soro de cavalo, meio de Gourlay), bem como um pH neutro e uma ligeira agitação da cultura que permita o arejamento e aumente a taxa de crescimento. As culturas de *MmmSC* em meio líquido têm uma aparência filamentosa, semelhante a uma nuvem que se dispersa facilmente por agitação, resultante do seu modo de reprodução (Carvalho, 2008). Em meio de cultura sólido as colónias têm um aspecto típico de “ovo estrelado” (Figura 1.9), com um diâmetro que raramente ultrapassa um milímetro (Carvalho, 2008; Thiaucourt *et al.*, 2004). Esta bactéria não sobrevive no ambiente, sendo facilmente inactivada em pH ácido ou alcalino, é susceptível ao éter, cloreto de mercúrio, hidróxido de cálcio, fenol e soluções de formaldeído.

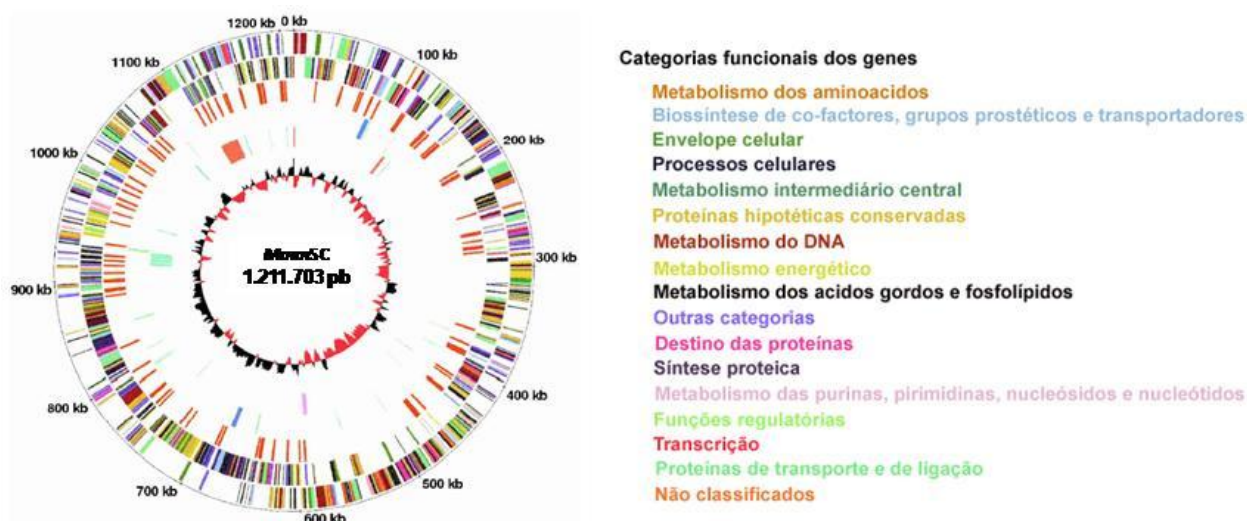


**Figura 1.9.** Colónias de *MmmSC* em meio de cultura sólido, com a aparência típica de “ovo estrelado” (adaptado de [www.genomenewsnetwork.org](http://www.genomenewsnetwork.org))

Desde 2004, ano em que foi publicada a sequência completa do genoma da estirpe tipo de *MmmSC* (PG1) (Westberg *et al.*, 2004), muitos avanços têm sido feitos em prol de um maior e melhor conhecimento das características genéticas desta espécie. O cromossoma desta estirpe é circular, com 1211703 pb, com um baixo conteúdo em guanina e citosina (24%) e uma das mais elevadas densidades de sequências de inserção de entre todos os genomas bacterianos sequenciados até à data (correspondente a cerca de 13% do seu genoma). Este genoma contém 985 genes, dos quais 72 destes genes fazem parte de sequências de inserção e codificam enzimas transposases (Figura 1.10).

As sequências de inserção em *MmmSC* são de três tipos: a) *ISMmyI*, presente na estirpe PG1 em oito cópias inteiras e uma cópia truncada (este tipo de IS também já foi descrito em *Mycoplasma bovis*, indiciando a ocorrência de fenómenos de transferência horizontal de genes entre esta espécie e *MmmSC*); b) *IS1634*, com 1872 pb e presente em 60 cópias (Vilei *et al.*, 1999); e c) *IS1296*, com 1485 pb e repetida 28 vezes no genoma (Frey *et al.*, 1995). Estas IS estão distribuídas ao longo de todo o genoma com a excepção de três regiões. A

ausência nestas regiões, parcialmente conservadas entre todos os micoplasmas, inclui os operões das proteínas ribossomais, os genes da síntese de ATP e o grupo de genes da piruvato-desidrogenase (Westberg *et al.*, 2004). Além dos elementos IS, existem também no genoma de *MmmSC* muitas sequências repetidas (29% do genoma), elas próprias flanqueadas por sequências de inserção (Westberg *et al.*, 2004). As maiores repetições têm 24 kb, 13 kb e 12 kb, albergando genes importantes tais como o *lppQ* (que codifica a lipoproteína Q), o *nox* (que codifica a NADH-oxidase), o *ptsG* (que codifica a permease do sistema fosfoenolpiruvato), o *oppF* (que codifica um transportador ABC) e os genes *phnB*, *phnC* e *phnD* (que codificam componentes de um transportador ABC alcilfosfonato) (Bischof *et al.*, 2006).

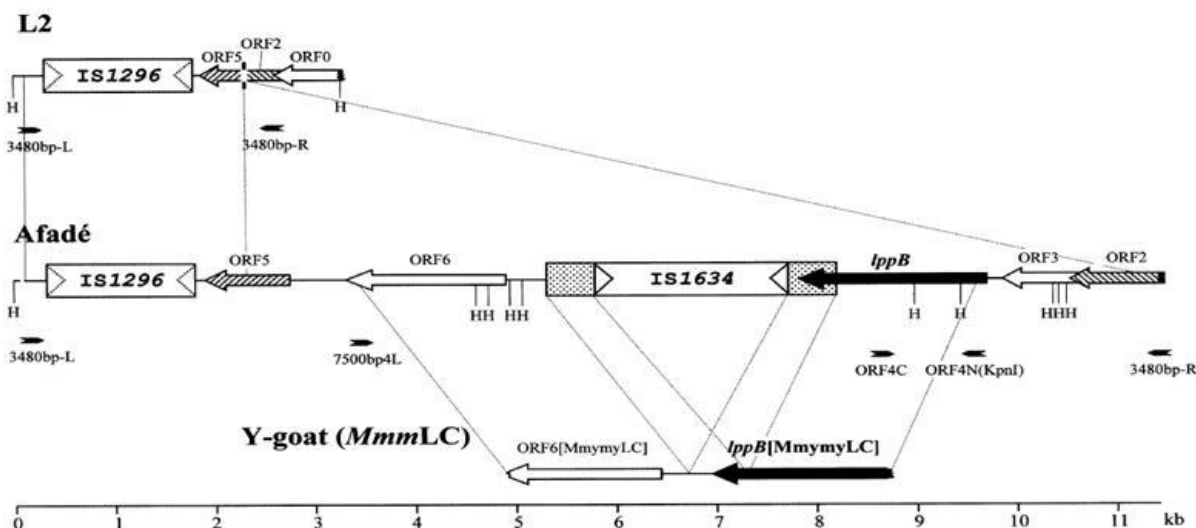


**Figura 1.10.** Representação circular do genoma de *MmmSC*. Os genes são indicados por barras de diferentes cores, representando categorias funcionais distintas; **Círculo externo** – posições genómicas em bases, em que a posição número um é a primeira base do gene *dnaA*; **Segundo círculo** – genes na cadeia positiva; **Terceiro círculo** – Genes na cadeia negativa; **Quarto círculo** - sequências de inserção; **Quinto círculo** – genes que codificam para o tRNA e rRNA; **Sexto círculo** – genes envolvidos na biossíntese da cápsula, peróxido de hidrogénio e proteínas variáveis de superfície; **Sétimo círculo** – distribuição do conteúdo em guanina e citosina (adaptado de Westberg *et al.*, 2004).

Actualmente sabe-se que a estirpe tipo de *MmmSC* PG1, a partir da qual foi obtida a sequência completa do genoma, não é a melhor representante do conjunto das estirpes desta espécie, pois o seu genoma apresenta particularidades únicas. Por exemplo, a duplicação do

segmento 24 kb é uma característica peculiar à estirpe PG1 e pode ter resultado de fenómenos de inserção e/ou excisão da sequência *IS1296* durante as numerosas passagens a que foi sujeita em meios de crescimento artificiais (Bischof *et al.*, 2006). O segmento 13 kb não existe nas estirpes europeias isoladas dos surtos mais recentes de PPCB (desde 1980) e só está presente em algumas estirpes africanas e australianas, o que constitui também um indicador da instabilidade da repetição de 13 kb durante as repetidas passagens (Bischof *et al.*, 2006). As repetições de 12 kb e 8 kb parecem ser as mais estáveis, tendo sido detectadas em duplicado ou em triplicado em todas as estirpes estudadas (Bischof *et al.* 2006).

A PPCB reemergente na Europa desde 1980 teve um comportamento mais insidioso e crónico com taxas de mortalidade mais baixas, quando comparada com as manifestações clínicas agudas e exacerbadas dos animais infectados nos países africanos (Vilei *et al.*, 2000). Esta diferença de sintomas foi, mais tarde, atribuída a variações nos próprios agentes infecciosos. A tipagem de um conjunto de estirpes de *MmmSC* de diferentes países e continentes, com uma sonda para *IS1296*, permitiu reconhecer dois grupos epidemiologicamente distintos desta espécie: um grupo contendo as estirpes europeias, isoladas desde 1980, e outro grupo englobando os isolados africanos e australianos recolhidos nos últimos 50 anos (Cheng *et al.*, 1995; Vilei *et al.*, 2000). Verificou-se também a existência de um segmento de cerca de 8,8 kb no genoma das estirpes africanas/australianas, adjacente a uma cópia de *IS1296*, que está ausente nas estirpes europeias (Vilei *et al.*, 2000). Este fragmento contém uma cópia de *IS1634*, o gene *lppB*, o ORF5 (que codifica duas proteínas membranares, sendo uma delas rica em resíduos prolina), o ORF2 e o ORF0 (que codificam “putativos” transportadores ABC) (Figura 1.11). A hipótese que se pondera é que a deleção deste fragmento nas estirpes europeias provocou a disrupção do operão *gtsABC* o que, conseqüentemente, poderá ter reduzido as suas capacidades para produzir peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tornando-as potencialmente menos virulentas (Houshaymi *et al.*, 1997; Vilei e Frey, 2001). Por outro lado, a expressão do gene *lppB* constitui uma diferença fenotípica significativa que diferencia as estirpes de origem africana e europeia, explicando também o carácter clínico agudo vs. crónico das doenças provocadas pelas estirpes de cada grupo (Vilei *et al.*, 2000). Também já foram identificados genes similares ao gene *lppB* em algumas estirpes de *MmmLC* e de *M. leachii* (Figura 1.11), o que pode explicar a ocorrência frequente de reacções serológicas cruzadas nos testes de diagnóstico para a PPCB (Vilei *et al.*, 2000).



**Figura 1.11.** Mapa genômico do locus de 8,8 Kb contendo o gene *lppB* em *MmmSC* e o seu análogo na estirpe de referência de *MmmLC* (Y-Goat). Este locus diferencia as estirpes de *MmmSC* africanas/australianas (representadas pela estirpe Afadé) das europeias (representadas pela estirpe L2), pela sua ausência nas segundas (adaptado de Vilei et al., 2000).

As características genéticas, como a presença de um elevado número de sequências repetidas e de sequências de inserção no genoma de *MmmSC*, demonstram a elevada plasticidade genotípica deste organismo, contribuindo também para a sua grande capacidade de adaptação a vários nichos.

## I.6. Mecanismos de patogenicidade em *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

Para causar doença, o *MmmSC* possui mecanismos particulares para aderir a tecidos específicos do hospedeiro, para invadir as suas defesas imunitárias, para permitir a sua persistência e disseminação no animal infectado e causar inflamação e sinais citopáticos, através da libertação de metabolitos citotóxicos (Pilo et al., 2007). A perda de alguns destes mecanismos pode conduzir à atenuação ou perda total da virulência por parte das estirpes. Várias moléculas localizadas na superfície externa da membrana plasmática destes micoplasmas, tais como lipoproteínas e polissacarídeos capsulares, protegem as bactérias da actividade bactericida do sistema do complemento e de células do sistema imunitário, funcionando também como desencadeadores do processo inflamatório no hospedeiro (Pilo et al., 2007).

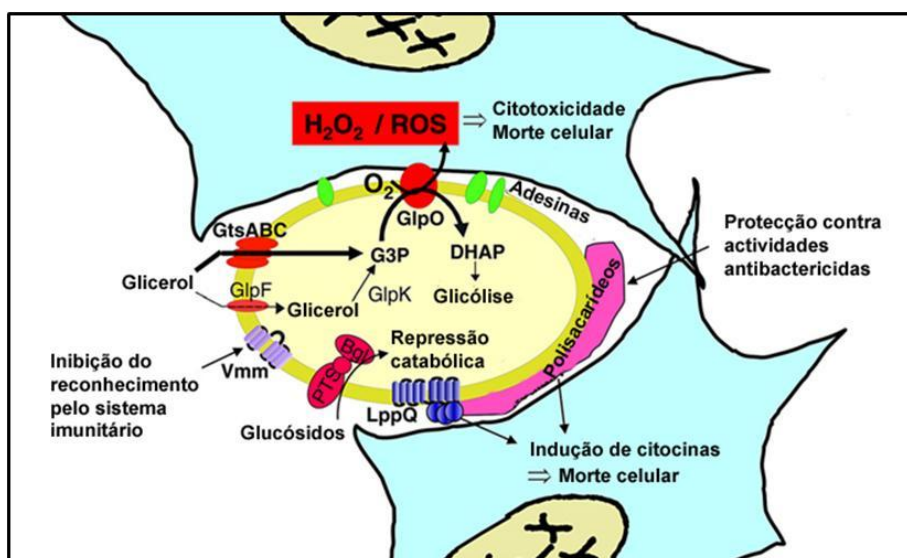
As lipoproteínas são moléculas importantes na interacção das bactérias com as células hospedeiras, nomeadamente nos processos de adesão (Pilo *et al.*, 2007). De entre as lipoproteínas mais bem caracterizadas em *MmmSC* destacam-se a LppA, altamente conservada nos micoplasmas do complexo *M. mycoides* (Monnerat *et al.*, 1999), e a LppB, encontrada apenas nas estirpes de *MmmSC* do subtipo africano/australiano, estando ausente nas estirpes europeias isoladas após 1980, embora já tenha sido detectada noutras espécies do complexo *M. mycoides*, em particular em *M. leachii*. A proteína LppC é expressa em todas as estirpes de *MmmSC* e noutras espécies de *Mycoplasma* menos virulentas (Pilo *et al.*, 2003), enquanto a LppQ está apenas presente em *MmmSC* (Abdo *et al.*, 2000; Bonvin-Klotz *et al.*, 2008; Pilo *et al.*, 2007). Esta última lipoproteína apresenta uma grande semelhança com as proteínas de carácter superantigénico, tendo a sua especificidade sido explorada para o desenvolvimento de um teste de ELISA mais robusto aplicável ao diagnóstico da PPCB (Bruderer *et al.*, 2002; Janis *et al.*, 2008; Pilo *et al.*, 2007).

A aderência dos micoplasmas às células hospedeiras é um factor particularmente importante na virulência destes microrganismos. Neste contexto, as adesinas, para além de activarem as vias de transdução de sinal na célula alvo e induzirem a inflamação (Razin *et al.*, 1998), são também, provavelmente, responsáveis pela especificidade de hospedeiro e pelo tropismo tecidular apresentados pelas diferentes espécies de micoplasmas. Embora várias adesinas tenham sido já identificadas nalgumas espécies de *Mycoplasma*, nenhuma foi ainda detectada em *MmmSC* (Pilo *et al.*, 2007).

A variação de fase é um mecanismo comum entre as espécies de micoplasmas. Este fenómeno leva à emergência de populações intra-clonais variáveis que mantêm uma arquitectura superficial dinâmica, antigénica e funcionalmente versátil, possibilitando a adaptação dos micoplasmas a um vasto leque de condições (Rottem, 2003). Uma proteína de 16 kDa de fase variável, denominada Vmm, que revelou uma variação reversível *ON-OFF* com alta frequência *per célula per geração*, foi encontrada nas estirpes de *MmmSC* (Pilo *et al.*, 2007). A variação desta proteína é regulada ao nível da transcrição por inserções ou deleções dos dinucleótidos AT numa região do promotor (Persson *et al.*, 2002; Westberg *et al.*, 2004). A função desta proteína não é ainda claramente conhecida, mas sugere-se que aumenta a capacidade de aderência de *MmmSC* e permite criar um mecanismo de escape ao sistema imunitário (Pilo *et al.*, 2007).



O peróxido de hidrogénio é um agente oxidativo que reage com os iões de cobre das células e fluidos corporais para formar radicais livres, incluindo o superóxido e os radicais hidroxilo, altamente tóxicos (Rice *et al.*, 2001). Este composto pode ser formado nos micoplasmas durante a oxidação dos açúcares, ácidos gordos e glicerol (Miles, 1992). Num modelo proposto recentemente para explicar as propriedades citotóxicas de *MmmSC*, o glicerol presente nos fluidos intersticiais é incorporado activamente na bactéria pelo transportador GtsABC e, posteriormente, fosforilado a glicerol-3-fosfato (G3P). O G3P é oxidado pela enzima L- $\alpha$ -glicerofosfato oxidase (GlpO), para formar dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), libertando  $H_2O_2$  (Figura 1.12) (Pilo *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2001). Quando existe contacto íntimo entre os micoplasmas e a membrana da célula hospedeira o  $H_2O_2$ , ou as espécies de oxigénio reactivas (ROS), entram nesta última e actuam como um poderoso mediador de danos celulares e indutor de processos inflamatórios (Pilo *et al.*, 2005; Pilo *et al.*, 2007). Desta forma, a toxicidade provocada pelo *MmmSC* está claramente dependente de um mecanismo de aderência eficiente entre as bactérias e as células hospedeiras, que permite a acção do  $H_2O_2$  a curtas distâncias (Bischof *et al.*, 2008).

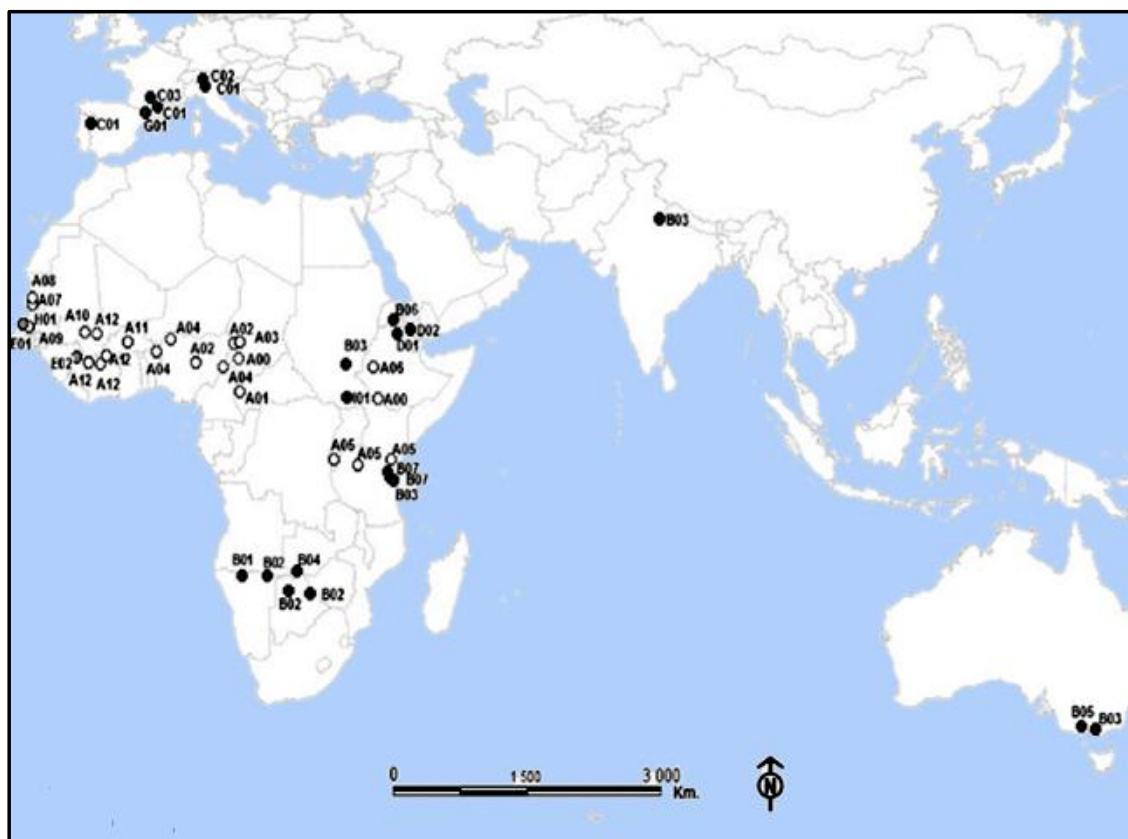


**Figura 1.12.** Representação esquemática das várias vias de virulência de *MmmSC* (adaptado de Pilo *et al.*, 2007).

### **I.7. Biogeografia de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC**

As estirpes de *MmmSC* foram consideradas geneticamente muito homogêneas entre si até 1995. Porém, com o advento da crescente utilização de métodos moleculares de tipagem mais discriminantes foram reveladas diferenças genéticas intraspecíficas relevantes nesta espécie, principalmente entre as estirpes africanas e australianas (Poumarat e Solsona, 1995). A aplicação de uma técnica de *Southern Blotting*, utilizando a sequência de inserção IS1296 como marcador, permitiu discriminar dois grupos principais de *MmmSC*, africano/australiano e europeu, e detectar polimorfismos existentes entre as estirpes de origem africana (Cheng *et al.*, 1995). Mais recentemente, foi descrita uma ferramenta para a tipagem de estirpes de *MmmSC* baseada na análise de sequências de DNA multilocus (MLSA) (Lorenzon *et al.*, 2003). Para além de analisar a presença de polimorfismos em seis *loci* do genoma de *MmmSC*, estes autores avaliaram a presença ou ausência do fragmento genómico de 8,8 kb (ausente nas estirpes europeias). Foram assim obtidos quinze perfis de MLSA numa amostra de 48 isolados de *MmmSC*, para além de uma distinção clara entre as estirpes europeias, as da África subsaariana e as do sul e do ocidente africano. Foi também sugerido neste estudo que os surtos mais recentes de PPCB na Europa ocorreram por re-emergência da doença e não por uma re-introdução de origem africana. É de realçar a grande diversidade de perfis MLSA encontrados entre as estirpes de *MmmSC* da África subsaariana. Segundo alguns autores (Curasson, 1942), a PPCB já existia em África antes da sua introdução durante o período de colonização e, como tal, o processo evolutivo destas estirpes foi mais longo e contribuiu para a formação de mais polimorfismos alélicos. Uma estirpe ancestral de origem africana terá também alcançado uma dispersão global em meados do século XIX, fazendo com que os isolados australianos, indianos e alguns africanos mais recentes partilhassem o mesmo perfil alélico (Lorenzon *et al.*, 2003).

A publicação da sequência completa do genoma da estirpe tipo de *MmmSC*, em 2004 (Westberg *et al.*, 2004), permitiu aferir e melhorar as ferramentas de tipagem molecular para este microrganismo. Deste modo, uma versão melhorada da técnica MLSA, com novos *primers*, foi recentemente descrita por Yaya e colaboradores (2008). Foram estudados, nesta nova versão, os polimorfismos alélicos em oito *loci* do genoma de *MmmSC*. Deste estudo resultou a criação de três grupos principais de estirpes de *MmmSC* (A, B e C), por onde se distribuíam 31 perfis alélicos distintos, encontrados entre as 51 estirpes analisadas (Figura 1.13).



**Figura 1.13.** Distribuição geográfica dos perfis alélicos de *MmmSC*, determinados por MLSA, onde é possível observar a correlação entre o perfil das estirpes e a sua origem (*adaptado de Yaya et al., 2008*)

As estirpes do grupo A estavam confinadas ao ocidente e centro do continente africano, indiciando que a PPCB já existia no continente antes da colonização do século XIX. Em oposição, a localização das estirpes do grupo B, na região Este de África, sugeriu que a PPCB foi aqui introduzida a partir do influxo de animais infectados vindos da Europa, através de colónias italianas ou de expedições inglesas em 1868 (Yaya *et al.*, 2008). Por outro lado, as estirpes do grupo C correspondem às estirpes europeias mais recentes, isoladas após 1980, e à única estirpe europeia isolada em 1967 (Figura 1.13). As estirpes de *MmmSC* de origem europeia pós-1980 mostraram alelos peculiares que não foram observados nas estirpes não-europeias. Este facto sugere também, mais uma vez, que os surtos de PPCB ocorridos na Europa após 1980 não se deveram a uma re-introdução da doença a partir de África, antes pressupõem o seu ressurgimento a partir de um reservatório não identificado (p.e. caprinos ou ovinos), ou da circulação de estirpes pouco patogénicas e, consequentemente, dificilmente detectáveis que, por motivo desconhecido, recuperaram a virulência (Yaya *et al.*, 2008). Foi também evidenciado neste estudo uma ligação genética entre a estirpe europeia isolada em

1967 e os isolados do sul de África e Austrália, corroborando as informações históricas de introdução de PPCB nestas regiões durante a colonização do século XIX.

### **I.8. Objectivos do trabalho e plano da dissertação**

As estirpes de *MmmSC* responsáveis pelos surtos de PPCB que ocorreram na Europa entre 1980 e 1999, nomeadamente em Itália, França, Espanha e Portugal, têm sido tradicionalmente consideradas geneticamente muito homogéneas. No entanto, estudos recentes, baseados num número limitado de estirpes de origem europeia, evidenciaram uma heterogeneidade molecular intraespecífica superior à esperada. Deste modo, o primeiro grande objectivo deste trabalho foi aferir retrospectivamente a variabilidade genética intraspecífica num número alargado de estirpes de *MmmSC*, responsáveis pelos surtos de PPCB ocorridos em Portugal entre 1993 e 1998. Para tal foi utilizada uma técnica de tipagem baseada na análise do número variável de repetições em tandem (VNTR) no genoma destas estirpes, mantidas na colecção de culturas do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária. Por outro lado, os mecanismos de patogenicidade de *MmmSC* estão ainda pouco estudados, particularmente no que concerne à identificação e caracterização das moléculas envolvidas na aderência às células hospedeiras. Deste modo, o segundo grande objectivo deste trabalho foi a optimização de uma técnica baseada na hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes (FISH) possibilitando a detecção e a quantificação de micoplasmas aderidos a células eucariotas alvo, nomeadamente a células epiteliais de pulmão de embrião bovino (EBL). Esta técnica será certamente útil em estudos posteriores de citoaderência e para a detecção de micoplasmas em culturas celulares.

Esta dissertação divide-se em quatro capítulos. No primeiro, e actual, capítulo foi feita uma introdução geral, realçando as características, a importância e o impacto sócio-económico da Peripneumonia Contagiosa Bovina e do agente etiológico desta importante doença animal. No segundo capítulo é descrita a análise da variabilidade genética intraspecífica das estirpes de *MmmSC* responsáveis pelos últimos surtos de PPCB em Portugal. O terceiro capítulo é referente à optimização da técnica FISH aplicada à detecção e quantificação de micoplasmas aderentes a células eucariotas. Finalmente, no quarto e último capítulo, são tecidas considerações finais e perspectivas de trabalho futuro.



## ***CAPÍTULO II***

### **Variabilidade genética intraespecífica de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC**

#### **II.1. Introdução**

O género *Mycoplasma* inclui várias espécies bacterianas responsáveis por doenças em animais, nomeadamente os membros do complexo *Mycoplasma mycoides*. As espécies patogénicas mais importantes deste complexo são *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* (*Mccp*), responsável pela peripneumonia contagiosa caprina (PPCC), e *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (*MmmSC*), agente etiológico da peripneumonia contagiosa bovina (PPCB). Esta última doença é prevalente no continente africano e responsável por perdas na produção pecuária de valor inestimável, contribuindo para o empobrecimento das comunidades locais. A PPCB está erradicada na Europa desde Fevereiro de 1999, tendo o último surto sido reportado em Portugal. Historicamente, a PPCB re-emergiu em Portugal em Janeiro de 1983 numa exploração perto da fronteira espanhola, após um período de 30 anos de ausência (Regalla, 1984). Este acontecimento conduziu ao estabelecimento de um plano nacional de erradicação da PPCB, em 1989, de acordo com as recomendações da OIE. As regiões portuguesas mais afectadas pela doença situavam-se no norte e no centro do país, nas regiões de Entre-Douro e Minho e Beira Litoral devido, provavelmente, às condições climáticas propícias para a propagação do agente (zonas húmidas), a elevada densidade da população de bovinos, o tipo de exploração, de pequena dimensão e com áreas de pastagem comuns, e a ocorrência nestas regiões de um número elevado de feiras e mercados tradicionais de gado que facilitaram a transmissão da doença entre os animais (Gonçalves *et al.*, 1998). Alguns casos foram também documentados na Beira Interior, Ribatejo Oeste e Alentejo. O País adquiriu o estatuto da OIE de “ País livre de PPCB” em 2003.

Apesar das diferenças na origem geográfica e hospedeiros de isolamento, as estirpes europeias de *MmmSC*, em oposição ao que é observado entre as estirpes africanas/australianas, são tradicionalmente consideradas bastante homogéneas geneticamente entre si com base, nomeadamente, nos resultados da análise do número de cópias e posição cromossómica das sequências de inserção IS1296 (Botelho, 2001; Cheng *et al.* 1995) e IS1634 (Vilei *et al.*

1999), e por RFLP (Poumarat e Solsona, 1995). Mais recentemente, o desenvolvimento e aplicação de novas técnicas de genotipagem, tais como o MLSA (Lorenzon *et al.*, 2003; Yaya *et al.*, 2008) e a análise de VNTRs (McAuliffe *et al.*, 2007), evidenciou uma variabilidade genética acrescida entre as estirpes europeias de *MmmSC*. Entre os 60 VNTRs detectados no genoma da estirpe tipo de *MmmSC* (PG1), McAuliffe e colegas (2007) verificaram que três apresentavam variações alélicas entre diferentes estirpes desta espécie. Estes autores designaram estes *loci* polimórficos de VNTR4, VNTR5 e VNTR42. O *locus* VNTR4 está contido no interior do gene *nata*, que codifica um componente de ligação ao ATP de um transportador ABC Na<sup>+</sup> e uma proteína hipotética transmembranar; o VNTR5 abrange a região terminal do gene *nata*, uma região intergénica não codificante e termina dentro do *locus* MSC\_0399; e o VNTR42 posiciona-se no interior da região 8,8 Kb (já descrita anteriormente como estando ausente nas estirpes europeias de *MmmSC*), mais precisamente no interior da proteína transmembranar MSC\_0523. O VNTR4 apresentou oito perfis diferentes entre as estirpes de *MmmSC* estudadas pelos autores, incluindo estirpes africanas e europeias. A análise do VNTR5 apenas permitiu a distinção da estirpe africana Afadé das restantes 38 estirpes analisadas; e a diferenciação entre os isolados africanos/australianos e os europeus foi possível pela análise do VNTR42, ausente nos segundos. É ainda de realçar que as 18 estirpes europeias testadas foram diferenciadas em quatro perfis de VNTR4 distintos, comprovando a capacidade desta técnica de tipagem para estudar a diversidade de polimorfismos das estirpes europeias. Destas, oito estirpes de *MmmSC* eram portuguesas e foram distribuídas por quatro tipos moleculares (correspondentes a diferentes perfis alélicos de VNTR4). Estes dados levantaram a dúvida sobre a causa dos últimos surtos de PPCB em Portugal, ou seja, se teriam sido causados por uma única estirpe virulenta de *MmmSC*, prevalente em todos os territórios afectados, ou por várias estirpes, com características distintas e, eventualmente, dominantes em diferentes territórios. Neste trabalho foi realizada uma análise epidemiológica retrospectiva, com base num número alargado de estirpes de campo de *MmmSC* mantidas em colecção no LNIV, com diferentes origens geográficas em Portugal, de modo a tentar responder a esta questão.

## **II.2. Materiais e métodos**

### **II.2.1. Estirpes analisadas**

Neste trabalho foram estudadas 81 estirpes pertencentes ao complexo *Mycoplasma mycoides* (Tabela 1), mantidas na colecção de culturas do LNIV a – 80 °C. Sessenta e cinco destas estirpes correspondem a *MmmSC* isoladas durante os surtos de PPCB que ocorreram em Portugal entre 1993 e 1998. Os isolamentos foram feitos a partir de pulmão ou gânglios linfáticos de bovinos, um caprino e um ovino das regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro, Entre Douro e Minho e Beira Litoral Norte (Tabela 1). Os restantes 16 isolados englobam as estirpes vacinais (T1-SR e KH3J), estirpes de referência de *MmmSC* africanas/australianas, a estirpe L2 (representante das estirpes europeias de *MmmSC*), a PG1 (estirpe tipo de *MmmSC*) e estirpes de outras espécies do complexo *Mycoplasma mycoides* (*MmmLC*, *Mccp* e *M. leachii*) (Tabela 1).

A identificação das estirpes de *MmmSC* foi anteriormente realizada no LNIV através de testes bioquímicos (teste da glucose, da arginina, da fosfatase e do tetrazólio), testes de inibição de crescimento com soros hiperimunes de coelho, análise da morfologia das colónias, testes serológicos e métodos moleculares, nomeadamente a amplificação por PCR da região CAP-21 seguido da sua restrição com a enzima *AsnI* (Bashiruddin *et al.*, 1994; Botelho, 2001; Miserez *et al.*, 1997).

### **II.2.2. Condições de cultura**

As estirpes de micoplasmas foram descongeladas, a partir de alíquotas conservadas a –80 °C, e inoculadas em cinco ml de meio líquido de Hayflick, numa proporção de 1:10 (Anexo). A incubação realizou-se numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 8 dias a 37 °C.

### **II.2.3. Testes bioquímicos**

Algumas estirpes de *MmmSC* foram re-testadas neste trabalho em relação a algumas das suas propriedades metabólicas, de modo a confirmar a sua identidade. Os testes realizados consistiram na análise da sensibilidade à digitonina, a fermentação da glucose, a hidrólise da arginina, a actividade da fosfatase e a redução do tetrazólio. Os resultados esperados destes testes para as várias espécies de micoplasmas, incluindo *MmmSC*, encontram-se em Anexo.



### *Sensibilidade à digitonina*

Inocularam-se directamente 250 µl (10 gotas de 25 µl) de uma cultura de micoplasma, com quatro dias de desenvolvimento em meio líquido Hayflick, por inundação numa placa de meio Hayflick sólido (Anexo). Retirou-se o excesso, deixou-se secar à temperatura ambiente e colocou-se um disco impregnado de digitonina no centro da placa. Após incubação de 4 dias a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> observou-se as placas ao microscópio óptico e a olho nu para avaliar a morfologia, o tamanho das colónias e a existência e dimensão do halo de inibição de crescimento.

### *Fermentação da glucose*

Prepararam-se tubos de ensaio com 5 ml de meio líquido para a análise bioquímica da fermentação da glucose (Anexo), que foram inoculados com 150 µl (6 gotas de 25 µl) da cultura de micoplasma em meio Hayflick líquido com 4 dias de incubação. Os tubos foram incubados a 37 °C em atmosfera normal e o resultado foi registado ao fim de 4 dias.

### *Hidrólise da arginina*

Prepararam-se tubos de ensaio com 5 ml de meio líquido para a análise bioquímica da arginina (Anexo), que foram inoculados com 150 µl (6 gotas de 25 µl) da cultura de micoplasma em meio Hayflick líquido com 4 dias de incubação. Os tubos foram incubados a 37 °C em atmosfera normal e o resultado foi registado ao fim de 4 dias.

### *Actividade da fosfatase*

Prepararam-se tubos de ensaio com 5 ml de meio líquido para a análise bioquímica da fosfatase (Anexo), que foram inoculados com 150 µl (6 gotas de 25 µl) da cultura de micoplasma em meio Hayflick líquido com 4 dias de incubação. Os tubos foram incubados a 37 °C em atmosfera normal e o resultado foi registado ao fim de 4 dias, após a adição de duas gotas (50 µl) de hidróxido de sódio (NaOH) a 5%.

### *Redução do tetrazólio (MTT)*

Prepararam-se tubos de ensaio com 5 ml de meio líquido para a análise bioquímica do tetrazólio (Anexo), que foram inoculados com 150 µl (6 gotas de 25 µl) da cultura de micoplasma em meio Hayflick líquido com 4 dias de incubação. Os tubos foram incubados a 37 °C em atmosfera normal e o resultado foi registado ao fim de 4 dias.

#### II.2.4. Extracção de DNA

Para a extracção de DNA genómico a partir das culturas de micoplasmas foi utilizado um método simples baseado na fervura das mesmas. Foram preparadas alíquotas de 500 µl da cultura em meio líquido Hayflick, com 4 dias de incubação, em microtubos esterilizados. As alíquotas foram centrifugadas a 1500 ×g durante 5 minutos (Centrifuge 5415D, Eppendorf). Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 70 µl de água bidestilada estéril, agitou-se no vórtex e incubou-se a 95 °C em banho de água durante 30 minutos. Após esta incubação, a suspensão foi centrifugada a 1500 ×g durante um minuto e o sobrenadante, contendo DNA genómico, foi transferido para um novo microtubo e congelado a – 20 °C até ser utilizado. Não foi executado nenhum passo de purificação adicional do DNA extraído, e o mesmo foi diluído em água bidestilada estéril (1:10) antes da sua utilização nas reacções de PCR.

#### II.2.5. PCR-REA da região CAP-21

A identidade de alguns dos isolados de micoplasmas foi confirmada por PCR-REA da região CAP-21, de acordo com procedimentos adaptados de Bashiruddin e colegas (1994). Este método baseia-se na amplificação de um segmento da região genómica CAP-21, com 574 pb, presente em todos os membros do complexo *M. mycoides*. Posteriormente, segue-se a digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição *AsnI*, detectando-se dois (379 e 178 pb) ou três (220, 178 e 153 pb) fragmentos em gel de electroforese, caso se esteja na presença de estirpes de *MmmSC* ou *MmmLC/Mmc*, respectivamente. A reacção de PCR foi realizada num termociclador MJMini<sup>TM</sup> (Bio-Rad), para um volume final de 25 µl contendo 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dNTPs (Promega), 1 µM de cada *primer* MM450 (5'-GTA TTT TCC TTT CTA ATT TG-3') e MM451 (5'-AAA TCA AAT TAA TAA GTT TG-3'), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), e respectivo tampão 1×, e 1 µl de suspensão de DNA extraído e diluído. As misturas foram sujeitas a 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C e 2 min a 72 °C, durante 30 ciclos de amplificação. Os produtos amplificados (5 µl) foram analisados por electroforese através de um gel de agarose a 1,5% durante 2 h a 90 V (Sub-Cell<sup>®</sup> GT, Bio-Rad). A marcação das bandas de DNA foi obtida com GelRed<sup>TM</sup> (Biotium) e observada num transiluminador UV (UV Transilluminator, UVP), de acordo com as instruções do fabricante. A digestão enzimática consistiu na preparação de uma mistura de reacção, com um volume final de 10 µl contendo 5 µl de água bidestilada, 2 µl do produto de PCR, 2 µl da solução de endonuclease *AsnI* 5U (Boehringer Mannheim GmbH) e 1 µl do respectivo tampão 10×. A

mistura foi em seguida incubada a 37 °C durante 1 h. Para a observação dos fragmentos digeridos, preparou-se um gel de agarose a 2% e 5 µl do produto foi sujeito a electroforese durante 1 h a 100 V. A visualização dos fragmentos foi feita através do transiluminador UV com recurso à utilização do GelRed™, de acordo com as instruções do fabricante.

## II.2.6. Obtenção de perfis de VNTR

A análise dos perfis de VNTR das estirpes portuguesas de *MmmSC* foi realizada de acordo com o descrito por McAuliffe e colegas (2007). Foram analisados os seguintes *loci*: VNTR4 (posição no genoma da estirpe PG1: 452035 - 452162), VNTR5 (posição no genoma da estirpe PG1: 452875 - 452925) e VNTR42 (posição no genoma da estirpe PG1: 595886 - 596099). Estes *loci* foram amplificados por PCR com os seguintes pares de *primers*: 4F (5'-AAT CAG CGT GAT TCA GCT TT-3') e 4R (5'-TTG CTT TGA TTA ACT TGT TG TTT T-3') para o VNTR4; 5F (5'-TGA ACA AAA TAA ATT ACG TGA AAT G-3') e 5R (5'-AAG TTT AAG ATG CAA AAC AAA CG-3') para o VNTR5; e 42F (5'-ATT ATG ATG ATG GAG AGC AA-3') e 42R (5'-CAT TCT GCT TTT CAA GAT GT-3') para o VNTR42. Foram preparadas três soluções de PCR para cada estirpe de micoplasma a analisar, de forma a amplificar cada um dos três VNTRs seleccionados (VNTR4, VNTR5 e VNTR42), para um volume final de 25 µl contendo 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs (Promega), 0,4 mM de cada *primer* (4F/4R, 5F/5R ou 42F/42R) (Invitrogen), 0,5 U de *Taq* polimerase (Promega) e respectivo tampão 1× e 1 µl de solução diluída de DNA extraído. As amostras foram sujeitas a um passo inicial de desnaturação a 94 °C durante 5 min e, posteriormente, a 30 ciclos de amplificação de 1 min a 95 °C, 45 s a 56 °C, 1 min a 72 °C e, por fim, a um passo de extensão final de 10 min a 72 °C (MJMini™, Bio-Rad). Os produtos de PCR foram analisados por electroforese a 45V durante 8 h (Sub-Cell® GT, Bio-Rad), através de um gel de agarose a 3% (Lonza). Em cada gel foram adicionados os marcadores de pesos moleculares Hyperladder III e Hyperladder IV (Bioline) (5 µl). A visualização foi realizada num transiluminador UV (UV Transilluminator, UVP) com auxílio de GelRed™ (Biotium) para a marcação das bandas de DNA, de acordo com as instruções do fabricante. O programa informático GELCOMPAR II (Applied Maths) foi utilizado para determinar a dimensão das bandas de DNA, através da análise de fotografias digitais dos géis de electroforese. De acordo com o tamanho dos produtos de PCR, cada VNTR foi classificado por um sistema numérico de modo a identificar os tipos moleculares (ver *Resultados e Discussão*).

### II.2.7. Análise *in silico* de sequências nucleotídicas de DNA

A análise comparativa das sequências de DNA foi realizada através do seu alinhamento usando o software CLUSTAL X v2.0. As sequências analisadas, correspondentes aos *loci* VNTR4, VNTR5 e VNTR42, foram obtidas a partir da base de dados do NCBI-GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com os números de acesso EU000517, EU000518, EU000519, EU000520, EU000521, EU000522, EU000523 e EU000524, para a região VNTR4 do *MmmSC*, EU010387 e EU010388, representativos da região VNTR5, e NC005364 e NC007633, correspondentes às sequências dos genomas das estirpes tipo de *MmmSC* (PG1) e de *M. capricolum* subsp. *capricolum* (ATCC 27343), respectivamente. A especificidade dos *primers* foi testada *in silico* usando a ferramenta BLAST (NCBI).

### II.2.8. Análise estatística

O Índice de Diversidade de Simpson, que reflecte a probabilidade de duas estirpes não relacionadas serem agrupadas em grupos distintos, foi determinado de acordo com Hunter e Gaston (1988). Para tal, foi utilizada a seguinte fórmula, em que “D” é o Índice de Diversidade de Simpson (que varia entre 0 e 1), “N” é o número total de estirpes de todos os tipos moleculares, “n” é o número de estirpes de um determinado tipo molecular “j”, e “S” é o número total de tipos moleculares.

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

### II.3. Resultados e discussão

Neste trabalho foram estudadas 65 estirpes de *MmmSC*, isoladas no LNIV durante os surtos de PPCB ocorridos em Portugal entre 1993 e 1998, e mantidas na colecção de culturas deste laboratório (Tabela 1). A identidade destas estirpes foi reconfirmada neste trabalho, recorrendo a testes bioquímicos e moleculares. No entanto, alguns testes bioquímicos foram inconclusivos e demonstraram um certo grau de variabilidade e subjectividade na sua interpretação. Para confirmar a identidade das estirpes *MmmSC* os resultados foram positivos para a fermentação de glucose (cor amarelo intenso) e redução do tetrazólio (mudança de cor para vermelho) (ver Anexo). Nas situações em que os resultados bioquímicos foram duvidosos recorreu-se à análise molecular por PCR-REA da região CAP-21 (resultados não apresentados).

Com vista à análise da variabilidade intraspecífica foram estudados, para cada estirpe, os marcadores polimórficos VNTR4, VNTR5 e VNTR42. Ao analisar *in silico* o posicionamento dos *primers* descritos por McAuliffe e colegas (2007) para a amplificação destes VNTR, em relação à sequência nucleotídica do genoma da estirpe tipo de *MmmSC* (PG1), verificámos que os *primers* 42F e 42R, utilizados para amplificar o *locus* VNTR42, aparentavam estar incorrectamente desenhados. Isto é, o fragmento amplificado por estes *primers* localiza-se a jusante (entre os resíduos 596976 e 598198) da região que os autores descreveram como correspondendo ao VNTR42 (localizado entre os resíduos 595886 e 596099). Este facto poderá aliás explicar porque não foram encontrados quaisquer polimorfismos no VNTR42 entre as várias estirpes africanas por eles analisadas (e que são reconhecidas como geneticamente muito heterogéneas). Estes *primers*, apesar de não amplificarem um VNTR polimórfico, amplificam um fragmento conservado interior ao segmento de 8,8 Kb. Por este motivo, os *primers* 42F e 42R foram utilizados no nosso trabalho para inferir a presença ou ausência da região genómica de 8,8 Kb nas estirpes analisadas e, assim, distinguir entre os isolados europeus e africanos/australianos. Deste modo, a designação VNTR42 foi substituída neste trabalho pelo termo “região 8,8 Kb” (Tabela 1).

Nenhuma estirpe portuguesa de *MmmSC* apresentou produto de amplificação com a utilização dos *primers* 42F e 42R (Tabela 1). No entanto, é de destacar que este fragmento também não foi detectado em algumas das estirpes de referência africanas testadas neste trabalho, nomeadamente nas estirpes Gemu Goffa e Dakar 2144 (Tabela 1). Nos casos em que houve amplificação, os fragmentos de DNA nos géis de electroforese, apesar de apresentarem todos

o mesmo tamanho, mostraram-se por vezes pouco nítidos. Não temos uma explicação evidente para tal facto, sendo necessária a realização de novos testes, nomeadamente com a análise de novas alíquotas de culturas destas estirpes e a eventual re-optimização da reacção de PCR (dado que o fragmento a amplificar é relativamente longo, com cerca de 1220 pb). De qualquer modo, e uma vez que esta região genómica não está presente nas estirpes portuguesas, não foi para já considerado prioritário neste trabalho a resolução destas discrepâncias nas estirpes de referência africanas.

O VNTR4 foi o único *locus* que se revelou polimórfico entre as estirpes portuguesas de *MmmSC* (Tabela 1; Figura 2.1). Aliás, já anteriormente este VNTR4 tinha sido considerado o *locus* mais polimórfico entre os isolados europeus e africanos desta espécie (McAuliffe *et al.*, 2007). No entanto, neste trabalho não foi seguida a notação proposta por McAuliffe e colegas (2007) para identificar os vários tipos alélicos do VNTR4, que se baseava num procedimento algo subjectivo. É assim proposto neste trabalho um alinhamento alternativo das regiões VNTR4 (Figura 2.2), em que são utilizadas as mesmas sequências usadas por McAuliffe e colegas (2007), correspondentes às estirpes de *MmmSC* Tan8, Matapi, M545/91 (de origem portuguesa), 6512 (de origem portuguesa), 6305 (de origem portuguesa), PG1 (estirpe tipo), M375 e KH3J (estirpe vacinal). Verifica-se que a maioria das estirpes tem as cópias da sequência de consenso do VNTR4 (ATAATAACAATA) completas ou quase completas (Figura 2.2). No entanto, são detectadas algumas mutações e inserções/delecções em algumas delas. Um exemplo desse fenómeno ocorre na última repetição da sequência de consenso do VNTR4, em que a maioria das estirpes de *MmmSC* apresenta as mesmas alterações, isto é, a substituição de uma adenina por uma timina, a inserção de uma timina e a delecção da última adenina, passando a sequência a ser ATAATATTCAAT (Figura 2.2). Com base neste alinhamento, torna-se justificável a metodologia alternativa usada neste trabalho para a identificação dos tipos moleculares do VNTR4: cada tipo molecular VNTR4 é identificado em função do número de cópias da respectiva sequência de consenso. O número de cópias da sequência de consenso do VNTR4 é inferido a partir da informação dos pesos moleculares dos fragmentos de DNA amplificados (tendo também em conta o tamanho médio de 12 pb da sequência de consenso). Por exemplo, McAuliffe e colegas (2007) atribuíram à estirpe PG1 um perfil de VNTR4 do tipo “6” (de acordo com o seu sistema de classificação). De acordo com a nossa proposta, sugerimos que esta mesma estirpe apresente um perfil de VNTR4 do tipo “9”, dado que contém no seu genoma nove cópias completas da respectiva sequência de consenso (Figura 2.2).

**Tabela 1.** Estirpes analisadas neste trabalho, respectivas origens geográficas e resultados da análise dos *loci* VNTR4, VNTR5 e região 8,8 Kb.

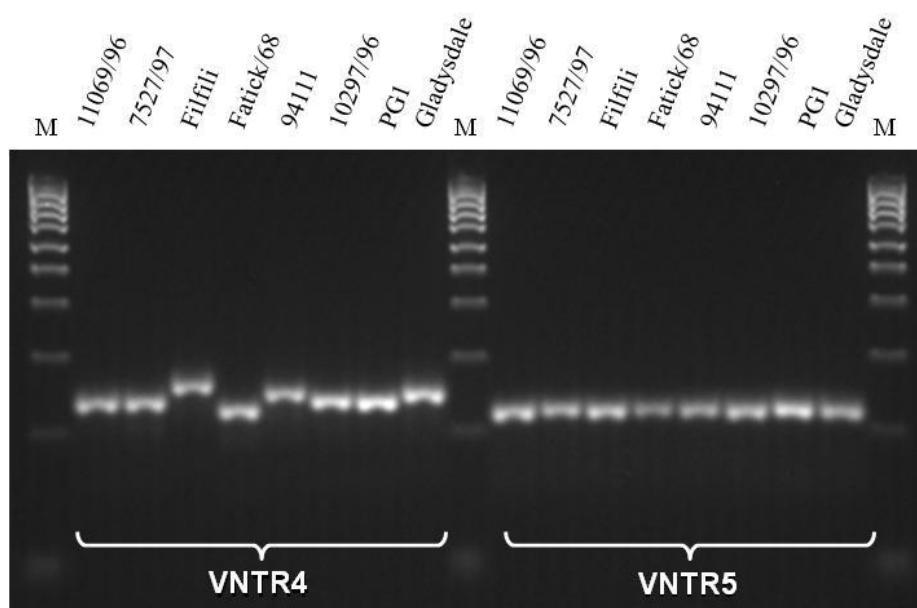
Estirpe/Ano de isolamento	Origem geográfica	Cópias <i>IS1296</i> <sup>(1)</sup>	Padrão <i>IS1296</i> <sup>(1)</sup>	Região 8,8 Kb <sup>(2)</sup>	VNTR4 <sup>(3)</sup>	VNTR5 <sup>(4)</sup>
B421/93	Aveiro (BL)	nd	nd	0	8	1
B994/93	Aveiro (BL)	18	E1	0	8	1
2886/96; 2887/96	Aveiro (BL)	nd	nd	0	8	1
4313/97	Aveiro (BL)	18	E1	0	8	1
B674/93	Mirandela (TMAD)	18	E1	0	9	1
B675/93	Mirandela (TMAD)	18	E1	0	11	1
B356/93	Mirandela (TMAD)	18	E1	0	3	1
1566/96	Mirandela (TMAD)	nd	nd	0	9	1
6147/97; 6148/97	Barcelos (EDM)	18	E1	0	9	1
7511/97	Barcelos (EDM)	nd	nd	0	9	1
363/97	Guimarães (EDM)	18	E1	0	9	1
4303/97	Guimarães (EDM)	18	E1	0	9	1
6097/97	Guimarães (EDM)	18	E1	0	9	1
7525/97; 7526/97	Matosinhos (EDM)	18	E1	0	9	1
1347/96	Paços de Ferreira (EDM)	nd	nd	0	9	1
1348/96	Paços de Ferreira (EDM)	nd	nd	0	9	1
1559/96	Paços de Ferreira (EDM)	nd	nd	0	9	1
4299/97; 4300/97	Paredes (EDM)	18	E1	0	9	1
B345/93	Porto (EDM)	18	E1	0	9	1
265/95	Porto (EDM)	18	E1	0	11	1
268/95	Porto (EDM)	18	E1	0	9	1
331P/95	Porto (EDM)	18	E1	0	9	1
333/95	Porto (EDM)	18	E1	0	9	1
5198/97	Porto (EDM)	18	E1	0	8	1
4306/97	Póvoa Varzim (EDM)	18	E1	0	9	1
5358/97; 5364/97	Póvoa Varzim (EDM)	18	E1	0	9	1
816/98	Póvoa Varzim (EDM)	18	E1	0	9	1
1670/98; 1672/98; 1674/98	Póvoa Varzim (EDM)	18	E1	0	9	1
10055/96	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
10297/96	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
10644/96	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
9503/96	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
327/97; 328/97; 340/97; 345/97; 351/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
11069/96	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
358/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
105/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
372/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
4308/97; 4309/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
4366/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1

Tabela 1. (Cont.)

Estirpe/Ano de isolamento	Origem geográfica	Cópias <i>IS1296</i> <sup>(1)</sup>	Padrão <i>IS1296</i> <sup>(1)</sup>	Região 8,8 Kb <sup>(2)</sup>	VNTR4 <sup>(3)</sup>	VNTR5 <sup>(4)</sup>
5385/97; 5387/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
6085/97; 6090/97; 6094/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
6092/97 <sup>ψ</sup>	Santo Tirso (EDM)	17	E3	0	9	1
6078/97; 6081/97; 6082/97	Santo Tirso (EDM)	18	E1	0	9	1
4310/97	Viana do Castelo (EDM)	18	E1	0	9	1
7527/97; 7528/97	Viana do Castelo (EDM)	18	E1	0	9	1
O326/93	Portugal	nd	E1 <sup>(5)</sup>	0	9	1
C305/93	Portugal	nd	E1 <sup>(5)</sup>	0	8	1
L2/93	Itália	18	E1	0	9	1
TPG1	Desconhecida	19 <sup>(5)</sup>	P <sup>(5)</sup>	1	9	1
Gladysdale/<64	Austrália	nd	A1 <sup>(5)</sup>	1	10	1
T1-SR/52	Tanzânia (África)	nd	A4 <sup>(5)</sup>	1	9	1
KH3J/40	Sudão (África)	nd	A2 <sup>(5)</sup>	1	12	1
Fatick/68	Senegal (África)	nd	A1 <sup>(5)</sup>	1	8	1
Gemu Goffa/74	Etiópia (África)	nd	nd	0	8	1
Dakar 2144/<68	Senegal (África)	nd	nd	0	11	1
94111/94	Ruanda (África)	nd	A6 <sup>(5)</sup>	1	10	1
Filfili/<88	Senegal (África)	nd	A3 <sup>(5)</sup>	1	11	1
<b>Estirpes de <i>MmmLC/Mmc</i></b>						
B529/93	Aveiro (BL)	nd	nd	0	2	1
2133/98	Porto (EDM)	nd	nd	nd	3	1
6087/97	Santo Tirso (EDM)	nd	nd	nd	6	1
Y-GOAT <sup>(6)</sup>		nd	nd	0	3	1 <sup>(7)</sup>
<b>Estirpes de <i>Mccp</i></b>						
F38 ( <i>Estirpe tipo</i> )		nd	nd	0	3	1 <sup>(7)</sup>
<b>Estirpes de <i>M. leachii</i></b>						
PG50 ( <i>Estirpe tipo</i> )		nd	nd	0	3	1 <sup>(7)</sup>

\* Todas as estirpes portuguesas foram isoladas de bovinos, com a exceção das estirpes O326/93 e C305/93 que foram isoladas de um ovino e caprino, respectivamente. Mais de uma estirpe na mesma linha significa que as mesmas foram isoladas durante o mesmo surto (mas a partir de diferentes bovinos). <sup>ψ</sup> Esta estirpe apresentou o único perfil distinto de padrão de *IS1296*, apesar de ter sido isolada no mesmo surto que as estirpes da linha anterior; BL = Beira Litoral, TMAD = Trás-os-Montes e Alto Douro, EDM = Entre Douro e Minho; <sup>1</sup>Resultados do número e padrão de *IS1296* determinados por Botelho (2001); <sup>2</sup>Ocorrência (1) ou ausência (0) de amplificação com os *primers* 42F e 42R; <sup>3</sup>Número de cópias estimado da sequência consenso do VNTR4; <sup>4</sup>Ocorrência (1) de amplificação com os *primers* 5F e 5R; <sup>5</sup>Resultados de Cheng *et al.* (1995); <sup>6</sup>Estirpe de referência de *MmmLC*; <sup>7</sup>Amplificação de fragmentos de DNA com tamanhos diferentes; nd = Não determinado.





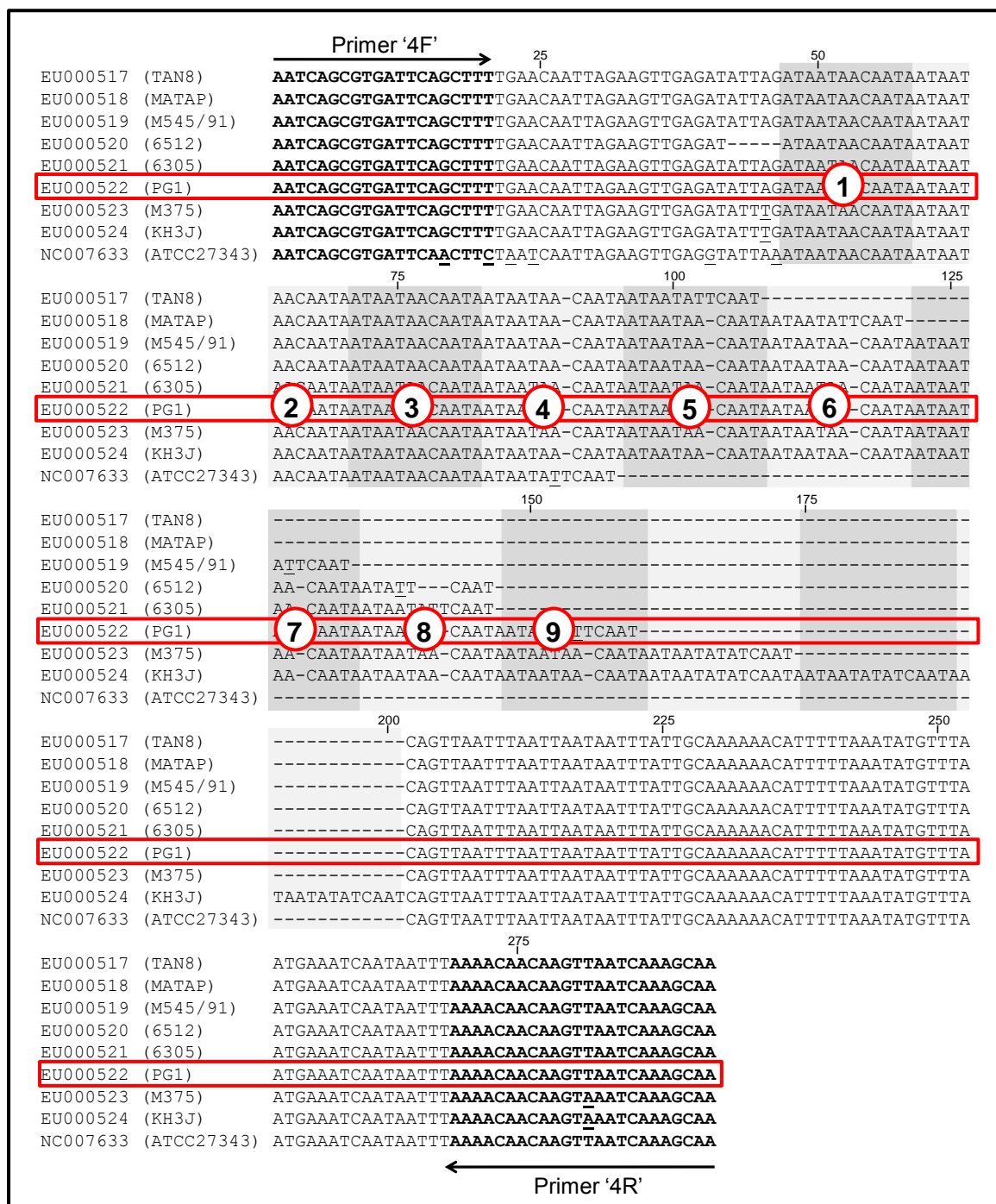
**Figura 2.1.** Gel de electroforese ilustrando os polimorfismos de tamanho do VNTR4 e ausência de polimorfismos no VNTR5 para oito estirpes representativas de *MmmSC*; M – Marcador de pesos moleculares IV (Bioline)

As estirpes portuguesas evidenciaram alguma heterogeneidade nos perfis de VNTR4 (Tabela 1, Figura 2.1). No entanto, a diversidade polimórfica encontrada neste *locus* não foi tão extensa como a que seria esperada pelos resultados preliminares obtidos por McAuliffe e colegas (2007). Apesar de terem sido encontrados quatro perfis distintos de VNTR4 entre os 65 isolados portugueses de *MmmSC* testados, a maioria das estirpes (84,6%) correspondia ao perfil de VNTR4 do tipo “9” (com nove cópias da sequência de consenso). O segundo maior grupo de estirpes (10,7%) apresentava o perfil de VNTR4 do tipo “8” (com oito cópias da sequência de consenso). Para além destes perfis, duas estirpes portuguesas (B675/93 e 265/93) apresentavam o perfil de VNTR4 do tipo “11” e a estirpe B356/93 o perfil de VNTR4 do tipo “3” (Tabela 1). Estes dados correspondem a um *Índice de Diversidade de Simpson* de 0,28 na análise geral das estirpes circulantes em Portugal entre o período de 1993 a 1998 (bastante inferior ao valor de 0,70 para este mesmo índice determinado com base nos resultados obtidos por McAuliffe e colegas (2007) para as estirpes *MmmSC* portuguesas). Verificou-se também que a diversidade de estirpes de *MmmSC* circulantes em Portugal aparentou diminuir ao longo do tempo. O *Índice de Diversidade de Simpson* correspondeu a 0,54 para o período compreendido entre 1993 e 1996, reduzindo-se para 0,09 no período seguinte (1997-1998). A contribuir para esta redução de diversidade entre as estirpes de

*MmmSC* circulantes poderá ter estado a grande pressão exercida para o controlo da PPCB, no âmbito do plano de erradicação da doença em vigor na altura no nosso país.

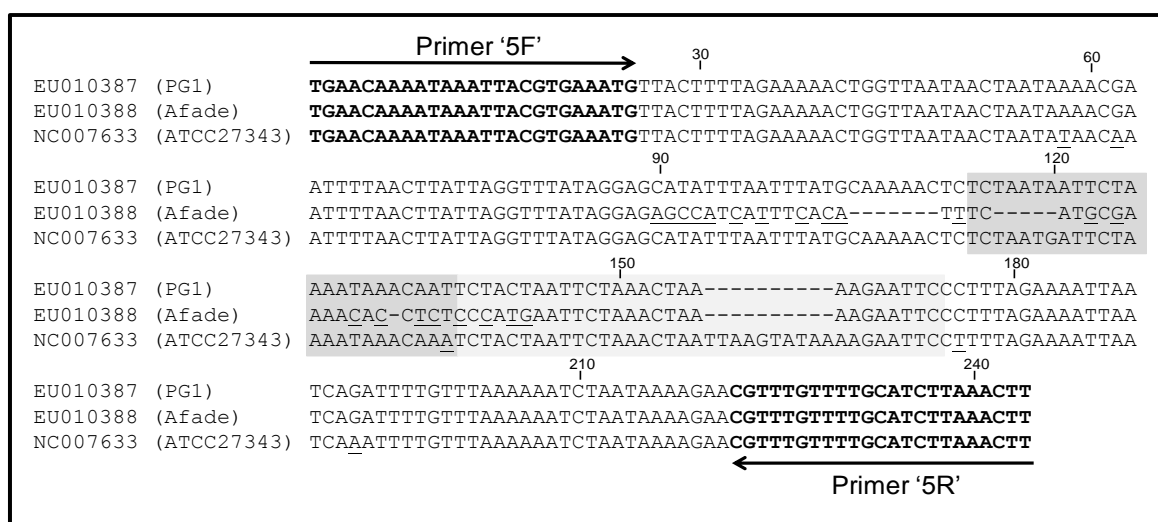
É de realçar que o mesmo tipo de sequência de consenso do VNTR4 também foi observado na região homóloga da estirpe tipo de *M. capricolum* subsp. *capricolum* (ATCC 27343) (Figura 2.2), sugerindo que esta região polimórfica poderá também ser usada para a tipificação de outros membros do complexo *M. mycoides*. Foram testadas, neste trabalho, três estirpes de campo portuguesas de *Mmc* e a estirpe de referência de *MmmLC* (Y-GOAT), tendo estas sido distribuídas por três perfis distintos de VNTR4 (Tabela 1). As estirpes de referência F38 (*M. capricolum* subsp. *capripneumonia*) e PG50 (*M. leachii*) evidenciaram ambas três cópias da sequência de consenso de VNTR4 (Tabela 1).

O número de cópias e o padrão no genoma da sequência de inserção *IS1296* foi previamente determinado para 56 das estirpes portuguesas de *MmmSC* testadas neste trabalho (Tabela 1) (Botelho, 2001). Destas, 55 estirpes apresentaram as mesmas 18 cópias da *IS1296* e o padrão correspondente “E1”, típico das estirpes europeias desta espécie (de acordo com Cheng e colegas, 1995; Varela *et al.*, 2010). Uma estirpe, 6092/97, apresentou um padrão distinto, denominado “E3” (Botelho, 2001), apesar do tipo de perfil de VNTR4 desta estirpe ter sido também o mais frequentemente encontrado em Portugal (tipo “9”) (Tabela 1). Esta estirpe foi isolada durante o mesmo surto das estirpes 6085/97, 6090/97 e 6094/97 que, no entanto, apresentaram todas o mesmo padrão de *IS1296* “E1”. A heterogeneidade nos perfis de VNTR4 entre as poucas estirpes africanas/australianas testadas neste trabalho foi bastante superior à verificada entre as estirpes Portuguesas, confirmando os resultados de outros estudos anteriores (McAuliffe *et al.*, 2007), nomeadamente com base noutros métodos de tipagem como o MLSA (Yaya *et al.*, 2008). As nove estirpes africanas/australianas testadas, incluindo a PG1, distribuíram-se por cinco perfis de VNTR4 distintos (Tabela 1). No entanto, a discriminação molecular destas estirpes com base nos perfis de VNTR4 não foi também totalmente congruente com os padrões de *IS1296* respectivos (Tabela 1). Na verdade, as estirpes Gladysdale (padrão de *IS1296* “A1”) e 94111 (padrão de *IS1296* “A6”) apresentaram ambas o mesmo perfil de VNTR4 do tipo “10”. Por outro lado, as estirpes Fatick/68 (VNTR4 do tipo “8”) e Gladysdale (VNTR4 do tipo “10”) apresentam ambas o mesmo padrão de *IS1296* “A1” (Tabela 1).



**Figura 2.2.** Alinhamento das sequências de VNTR4 de várias estirpes de *MmmSC* e das regiões homólogas correspondentes em *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (ATCC 27343). A designação das estirpes e os seus respectivos números de acesso do GenBank são indicados à esquerda. As repetições da sequência de consenso são representadas por caixas cinzentas de diferentes tons sobre o alinhamento. A sequência da estirpe tipo de *MmmSC*, PG1, está assinalada numa caixa a vermelho e as respectivas cópias da sequência de consenso do locus VNTR4 estão numeradas.

Relativamente ao VNTR5, não foi detectada nenhuma variação no tamanho do segmento amplificado com os *primers* 5F e 5R a partir das estirpes portuguesas de *MmmSC* (Tabela 1; Figura 2.1). Também as restantes estirpes de referência de *MmmSC* africanas e australianas testadas neste trabalho mostraram a amplificação de um mesmo fragmento com cerca de 220 pb (Tabela 1). Na realidade, também McAuliffe e colegas (2007) apenas observaram um polimorfismo neste *locus* para uma estirpe Africana (Afadé, não testada no nosso trabalho), de entre todas as estirpes testadas no seu estudo. O fragmento de DNA amplificado com os *primers* 5F e 5R apresentou um tamanho inferior para esta estirpe, correspondente a uma deleção de 13 bases quando comparado com a estirpe de referência PG1 (Figura 2.3). Contudo, de acordo com o nosso alinhamento desta região genómica (Figura 2.3), o segmento ausente na estirpe Afadé não parece corresponder a uma sequência consenso de VNTR5, tal como é definida por McAuliffe e colegas (2007). É ainda de mencionar que as sequências nucleotídicas das estirpes Afadé e PG1 mostram-se bastante divergentes neste suposto *locus* VNTR5, quando comparado com as respectivas regiões flanqueadoras (Figura 2.3), contrastando com a semelhança das mesmas regiões genómicas entre a mesma estirpe PG1 e *M. capricolum* subsp. *capricolum* (ATCC 27343), com a excepção de uma inserção de 10 bases na segunda. Ficamos pois com a dúvida se este *locus* corresponde mesmo a um VNTR. De qualquer modo, esta região aparenta ser polimórfica entre as poucas estirpes de *MmmLC/Mmc*, *Mccp* e *M. leachii* testadas (Tabela 1).



**Figura 2.3.** Alinhamento das sequências de VNTR5 das estirpes de *MmmSC* Afadé e PG1 e da região homóloga correspondente em *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (ATCC 27343). A designação das estirpes e os seus respectivos números de acesso do GenBank são indicados à esquerda. As repetições da sequência de consenso são representadas por caixas cinzentas de diferentes tons sobre o alinhamento.

Talvez o facto mais relevante deste estudo tenha sido a observação de uma aparente segregação geográfica das estirpes de *MmmSC* apresentando perfis de VNTR4 do tipo “8” e “9”. Na realidade, todas as estirpes com origem na região da Beira Litoral apresentaram um perfil de VNTR4 do tipo “8” (Tabela 1). Por outro lado, a esmagadora maioria das estirpes com origem na região de Entre-Douro e Minho apresentaram um perfil de VNTR4 do tipo “9” (Tabela 1). Estes resultados sugerem que poderão ter ocorrido pelo menos dois eventos principais de re-emergência da PPCB em Portugal, um por estirpes com o perfil de VNTR4 do tipo “8” no distrito de Aveiro (Beira Litoral), e outro por estirpes com o perfil de VNTR4 do tipo “9”, na região de Entre-Douro e Minho. Talvez uma maior capacidade adaptativa e/ou virulência destas últimas estirpes com o VNTR4 do tipo “9” tenha contribuído para a sua dispersão geográfica mais extensa no país. Alternativamente, um fenómeno de deleção ou inserção de uma cópia da sequência de consenso do VNTR4 poderia de algum modo explicar esta segregação geográfica de perfis. No entanto, este *locus* foi considerado bastante estável (McAuliffe *et al.*, 2007).

Como já foi anteriormente referido, duas estirpes de *MmmSC* testadas neste trabalho foram isoladas a partir de uma amostra de pulmão de caprino (C305/93) e leite de ovino (O326/93). Estas estirpes apresentaram perfis de VNTR4 do tipo “8” e “9”, respectivamente, correspondentes justamente aos dois tipos moleculares de *MmmSC* mais comuns entre os bovinos. Este resultados sugerem alguma relevância dos pequenos ruminantes como potenciais reservatórios de *MmmSC* e, como tal, estes animais deveriam ser tidos em conta no desenho de estratégias de controlo da PPCB. No entanto, há autores que defendem que estes animais são irrelevantes na epidemiologia desta doença (Yaya *et al.*, 2008).

Entre as estirpes portuguesas de *MmmSC* testadas neste trabalho, nenhuma foi utilizada no estudo de McAuliffe e colegas (2007). No entanto, estes autores descreveram dois perfis de VNTR4 adicionais entre as estirpes portuguesas por eles testadas que não foram detectados no nosso trabalho, inclusivamente os perfis do tipo “6” e “7” (correspondentes aos tipos “3” e “4”, respectivamente, segundo o seu sistema de notação). Por outro lado, algumas estirpes de referência e vacinais de *MmmSC* foram testadas em ambos os estudos. No entanto, foram encontradas algumas discrepâncias na determinação dos perfis de VNTR4 nos dois trabalhos. Nomeadamente, foi determinado no nosso estudo que as estirpes KH3J e Gladysdale apresentavam um perfil de VNTR4 do tipo “12” e “10”, respectivamente. No entanto, McAuliffe e colegas (2007) determinaram os tipos “11” para a estirpe KH3J e “8” para a

Gladysdale (correspondentes aos tipos “8” e “5”, respectivamente, segundo o seu sistema de notação). A contribuir para estas discrepâncias poderá estar alguma dificuldade na distinção do tamanho dos fragmentos de DNA, que diferem em poucos pares de bases, em géis de electroforese, como é o caso de uma cópia da sequência de consenso do VNTR4 (~ 12 pb).

Conclui-se assim que esta técnica de tipificação de *MmmSC* por análise de VNTRs, mais precisamente do VNTR4, é útil mas é necessário que os métodos de electroforese em gel de agarose estejam bem otimizados e que estirpes-controlo dos vários tipos moleculares sejam sempre usadas em paralelo às estirpes a testar (tal como foram usadas neste trabalho). A utilização de sistemas mais avançados de electroforese em capilar poderá também vir a tornar mais eficiente a identificação destes perfis. Apesar de, actualmente, estarem já bem estabelecidas técnicas de tipagem molecular para *MmmSC* mais discriminantes e precisas, como por exemplo a MLSA (Yaya *et al.*, 2008), a análise dos VNTRs é ainda de implementação mais rápida, fácil e menos dispendiosa, mantendo um nível de discriminação bastante aceitável. Para além de *MmmSC*, um método de tipagem baseado na análise de VNTRs também já foi descrito para outra espécie patogénica de ruminantes, *Mycoplasma agalactiae* (McAuliffe *et al.*, 2008).

Futuramente seria interessante comparar os perfis de VNTR obtidos para as estirpes portuguesas de *MmmSC* com os de estirpes de outras regiões da Europa onde ocorreram também surtos de PPCB no final do século passado, nomeadamente em Espanha, França e Itália, e assim obter uma perspectiva retrospectiva melhorada da epidemiologia da doença neste continente. Recentemente, pouco depois dos resultados deste trabalho terem sido divulgados (Varela *et al.*, 2010), foi publicado um estudo que utilizou procedimentos de tipificação idênticos para caracterizar 44 estirpes de *MmmSC* responsáveis pelos últimos surtos de PPCB ocorridos em Itália (entre 1990 e 1993) (Gosney *et al.*, 2010). Estes autores testaram as estirpes italianas para o VNTR4 e VNTR5, verificando a inexistência de polimorfismos nestes dois *loci* para todas as estirpes. Todas as estirpes testadas apresentaram um perfil de VNTR4 do tipo “4” (segundo o sistema de identificação proposto por McAuliffe e colegas, 2007 – *perfil não encontrado neste trabalho*). Estes resultados levaram Gosney e colegas (2010) a concluir que os surtos italianos de PPCB poderiam ter tido origem a partir de estirpes vindas de França, devido à importação de gado proveniente desse país. A contribuir para esta hipótese estariam também os resultados de tipificação de algumas estirpes de *MmmSC* francesas estudadas por McAuliffe e colegas (2007), que apresentavam o mesmo

perfil de VNTR4 das estirpes italianas. As estirpes de *MmmSC* italianas teriam também um tipo de VNTR4 distinto de todas as estirpes Portuguesas analisadas neste trabalho, o que levantaria questões bastante interessantes de um ponto de vista epidemiológico. No entanto, o estudo de Gosney e colegas (2010) parece apresentar uma inconsistência que, de alguma maneira, invalida as hipóteses epidemiológicas por eles levantadas e que nos impede também de realizar uma análise comparativa entre os dois trabalhos. Na verdade, para confirmar que as estirpes italianas correspondiam todas a um mesmo perfil de VNTR4 (do tipo “4”), os autores determinaram a dimensão dos fragmentos amplificados pelos *primers* 4F e 4R usando a técnica de electroforese capilar, chegando a um valor de 244 bases (Gosney *et al.*, 2010). No entanto, se remetermos ao trabalho onde esta técnica de tipificação foi originalmente descrita (McAuliffe *et al.*, 2007) e forem contabilizados o número de bases das regiões VNTR4 sequenciadas na altura pelos autores para uma estirpe representativa do perfil de VNTR4 do tipo “4” (estirpe 6512, número de acesso GenBank EU000520) (Figura 2.2), a esta corresponde uma dimensão de apenas 225 bases (com os *primers* 4F e 4R). Um fragmento amplificado do VNTR4 com uma dimensão de 244 bases é concordante, isso sim, com as estirpes representativas do tipo “6” (estirpe PG1, número de acesso do GenBank EU000522) (Figura 2.2). Este perfil de VNTR4 do tipo “6” equivale justamente ao nosso perfil “9” (de acordo com o sistema de identificação usado neste trabalho), que corresponde à maioria das estirpes portuguesas de *MmmSC*. A hipótese da introdução da PPCB em Itália a partir de França levantada por Gosney e colegas (2010) deixaria de ter assim fundamento, uma vez que este perfil não foi encontrado em nenhuma das estirpes francesas e italianas estudadas por McAuliffe e colegas (2007). Há assim que esclarecer com rigor qual o tipo de perfil de VNTR4 das estirpes de *MmmSC* italianas antes de se poderem discutir outras hipóteses sobre a epidemiologia da PPCB na Europa.

Alguns estudos sugerem que a re-emergência da PPCB na Europa após 1980 se deveu à introdução neste continente de uma estirpe ancestral africana (Vilei *et al.*, 2000), devido também à homogeneidade molecular observada na altura entre as estirpes europeias. No entanto, a utilização de métodos de tipagem molecular mais recentes demonstram que as estirpes europeias de *MmmSC* são claramente distintas das estirpes que circulam em África (Yaya *et al.*, 2008). Isto sugere que os últimos surtos de PPCB que ocorreram no final do século passado na Europa não se deveram a uma introdução a partir do continente africano, antes sim confirma uma re-emergência verdadeira da doença em alguns países europeus a partir de um reservatório ainda desconhecido, ou que as estirpes circulantes de *MmmSC* com

uma baixa patogenicidade tenham, por algum motivo, adquirido uma maior virulência (Cheng *et al.*, 1995; Lorenzon *et al.*, 2003; Yaya *et al.*, 2008). O facto das estirpes europeias de *MmmSC* serem geneticamente mais heterogêneas do que o anteriormente reconhecido, como demonstrado recentemente por McAuliffe e colegas (2007) e neste trabalho, tende a corroborar esta hipótese.

Em suma, o potencial de re-emergência da PPCB na Europa deve representar uma preocupação para todas as nações deste continente e deve, também, constituir um forte motivo para a manutenção e financiamento da pesquisa sobre esta doença e dos respectivos programas de vigilância.





## ***CAPÍTULO III***

### **Aplicação da técnica FISH para detectar micoplasmas aderentes a células eucariotas**

#### **III.1. Introdução**

Várias espécies de micoplasmas são agentes patogénicos bem sucedidos, capazes de estabelecer interações persistentes e causar doenças debilitantes nos humanos e em animais (Baranowski *et al.*, 2010). Estas espécies são normalmente parasitas de superfície celular, dispondo de um mecanismo de aderência presente na membrana plasmática que medeia o contacto íntimo com os receptores-alvo das células hospedeiras. A identificação dos componentes envolvidos nesta aderência tem ajudado a clarificar aspectos importantes das infecções de certas células eucariotas por micoplasmas (Thomas *et al.*, 2003b). Os mecanismos de aderência mais bem caracterizados dizem respeito às espécies *M. pneumoniae* (Krivan *et al.*, 1989), *M. bovis* (Sachse *et al.*, 1993) e *M. genitalium* (Ueno *et al.*, 2008), que colonizam o tracto respiratório humano e animal, e o tracto urogenital humano, respectivamente. Resultados obtidos a partir de estudos de inibição da citoaderência de *M. pneumoniae* (Krivan *et al.*, 1989) e de *M. bovis* (Sachse *et al.*, 1993) apontaram para uma semelhança entre a maioria dos componentes envolvidos neste complexo processo de aderência em ambas as espécies, incluindo a natureza glicolipídica e glicoproteica, com grupos sulfato e resíduos de ácido siálico, dos receptores das células hospedeiras. Embora várias proteínas de superfície estejam provavelmente envolvidas nos processos de aderência, relativamente poucas foram já identificadas nos micoplasmas, como por exemplo a proteína MAA1 em *M. arthritidis* (Washburn *et al.*, 2003), proteínas de superfície variável VspC e VspF em *M. bovis* (Thomas *et al.*, 2003b) e a proteína DRP em *M. agalactiae* (Baranowski *et al.*, 2010). Apesar do impacto económico da PPCB, pouco se sabe sobre os mecanismos de adesão do agente etiológico desta doença, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. No entanto, já foi demonstrado que esta bactéria adere a células epiteliais de embrião bovino (EBL) (Carvalho, 2008; Vilei *et al.*, 2007), e que a sua citoaderência é crucial para o efeito citotóxico que estas bactérias exercem sobre as células epiteliais do tracto respiratório (Bischof *et al.*, 2008).

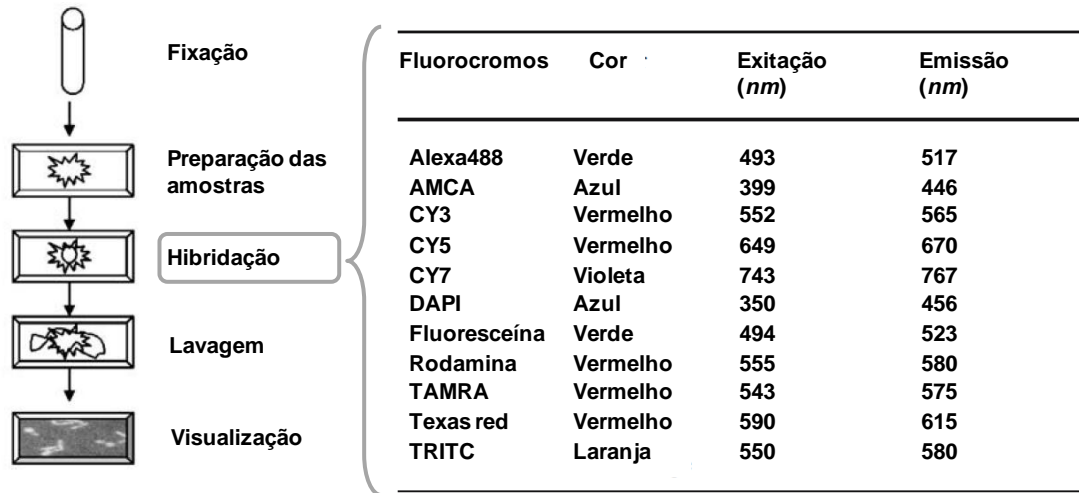
A maioria das técnicas usadas para estudar os mecanismos de aderência dos micoplasmas envolve a quantificação de células bacterianas aderentes a células eucariotas modelo (p.e.

eritrócitos, células EBL e células L-2 de pulmão de rato) após o tratamento com componentes inibitórios da aderência (p.e. sulfato de dextrano e glicoforina) (Athamna *et al.*, 1996; Sachse *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2003a, b), reacção com anticorpos monoclonais (Sachse *et al.*, 1993) ou efeitos de experiências de mutagénese (Baranowski *et al.*, 2010; Washburn *et al.*, 2003). O grau de aderência celular pode ser quantificado usando métodos de ELISA (Athamna *et al.*, 1996), contagens por marcação radioactiva (Krivan *et al.*, 1989; Sachse *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 2003a, 2003b) e, mais recentemente, PCR em tempo real (Bischof *et al.*, 2008). A visualização directa da disposição espacial dos micoplasmas sobre as células hospedeiras, a qual não é possível por meio destas técnicas, já foi conseguida, no entanto, pela utilização de métodos de imunofluorescência (Carvalho 2008; Svenstrup *et al.*, 2002).

A aliança entre a capacidade de visualizar microscopicamente a distribuição espacial das bactérias sobre as células hospedeiras, a detecção simultânea de multi-espécies em comunidades microbianas complexas (sem necessidade do seu cultivo), a análise quantitativa e a medição da actividade metabólica bacteriana podem ser alcançadas através da hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes (FISH). Conceptualmente, a técnica FISH é simples e consiste na hibridação de sondas oligonucleotídicas fluorescentes com sequências de ácidos nucleicos complementares nos organismos a detectar (como por exemplo para as moléculas de rRNA). A visualização dos resultados é proporcionada, na maior parte dos casos, por microscopia de epifluorescência. Esta técnica tem sido aplicada com sucesso em estudos de avaliação da diversidade microbiana em amostras ambientais e em complexos simbióticos (Amann *et al.*, 1995; Amann e Fuchs, 2008). Também já foi usada como ferramenta de diagnóstico para a detecção e identificação de bactérias patogénicas colonizadoras da cavidade oral, dos tractos respiratório e gastro-intestinal, bem como de outros tecidos humanos e animais (Moter e Göbel, 2000).

Um protocolo típico de FISH inclui quatro passos (Figura 3.1): 1) fixação e permeabilização da amostra, com o intuito de permitir a penetração das sondas de DNA nas células e proteger o RNA da degradação por RNases endógenas; 2) hibridação, por aplicação de um tampão de hibridação optimizado contendo as sondas fluorescentes complementares às sequências-alvo; 3) lavagem, para remover o excesso de sonda ou sonda não hibridada; e 4) secagem, montagem com agentes “*anti-fading*”, de forma a obter-se um sinal fluorescente mais duradouro, e observação dos resultados (Bottari *et al.*, 2006).

As sondas oligonucleotídicas para FISH têm normalmente entre 15 a 30 nucleótidos ligados covalentemente a um ou mais fluorocromos na extremidade 3' ou 5' e, na maioria das situações, são desenhadas com alvos complementares nas regiões 16S rRNA ou 23S rRNA. As moléculas de rRNA são os alvos preferenciais para esta técnica porque estão presentes em elevado número de cópias nas células, são estáveis, com regiões mais e menos conservadas entre espécies e existe bastante informação sobre as mesmas em bases de dados públicas de sequências de DNA (Bottari *et al.*, 2006). Contudo, o número de células-alvo detectado e a intensidade do sinal de fluorescência emitido são influenciados pelo estado fisiológico das células (o conteúdo de rRNA depende da fase de crescimento em que as células se encontram), bem como pela capacidade de hibridação da sonda com a região complementar alvo, que pode estar mais ou menos inacessível devido à formação de estruturas secundárias e terciárias, interações rRNA-rRNA e com proteínas ribossomais (Behrens *et al.*, 2003; Inácio *et al.*, 2003).



**Figura 3.1.** Ilustração dos passos principais da técnica FISH (à esquerda) e tabela representativa dos fluorocromos mais comuns utilizados na marcação das sondas oligonucleotídicas (à direita) (adaptado de Bottari *et al.*, 2006)

Tanto quanto sabemos, apenas um trabalho foi publicado até hoje sobre a aplicação de FISH na detecção de micoplasmas, mais precisamente na detecção de *M. hyopneumoniae* (Boye *et al.*, 2001).

Neste trabalho foi assim avaliada a aplicabilidade da técnica FISH para detectar micoplasmas, nomeadamente, *MmmSC* aderentes a modelos celulares eucariotas.

## **III.2. Materiais e métodos**

### **III.2.1. Estirpe analisada**

Foi seleccionada para este estudo a estirpe portuguesa B345/93 (7ª passagem), mantida a -80 °C. Esta estirpe está muito bem caracterizada, nomeadamente na capacidade de aderência às células EBL (Carvalho, 2008), e apresenta características estáveis ao longo de várias passagens.

### **III.2.2. Determinação da curva de crescimento de *MmmSC***

Para determinar a curva de crescimento, uma alíquota da 7ª passagem da estirpe B345/93 foi descongelada a 37 °C durante 2 h e ressuspensa em meio Hayflick (Anexo) numa proporção de 1/20 (para um volume final de 200 ml de meio de cultura). As culturas foram incubadas a 37 °C durante 3 dias e a actividade metabólica e viabilidade dos micoplasmas foi averiguada diariamente, através da contagem do número de unidades formadoras de colónias (UFC), do teste de redução de sais de tetrazólio (MTT) e da densidade óptica (DO).

#### *Determinação da densidade óptica (DO)*

Este parâmetro ajuda a avaliar a densidade de biomassa produzida ao longo tempo. Numa microplaca de 96 poços de fundo redondo colocaram-se 200 µl/poço da suspensão de micoplasmas, em 3 poços, e procedeu-se à leitura da DO por espectrofotometria a 630 nm (MRX<sub>II</sub>, Dinex). Utilizou-se como controlo negativo o meio Hayflick não inoculado. Após terem sido calculadas as respectivas médias dos 3 poços, a DO da cultura foi determinada por subtracção do valor médio da DO ao do controlo negativo.

#### *Teste da redução de sais de tetrazólio (MTT)*

O teste da redução de sais de tetrazólio, para avaliar a actividade metabólica dos micoplasmas, foi executado de acordo com o descrito por Lin *et al.* (2001). Brevemente, retiraram-se 700 µl da cultura aos quais foram adicionados 70 µl do reagente MTT. O controlo negativo realizou-se por substituição da cultura de *MmmSC* por meio Hayflick não inoculado. Após a agitação das amostras, seguiu-se um período de incubação de 45 min a 37 °C, seguido por uma centrifugação a 10 000 ×g (Sigma 3K10, rotor nº 12154) a 4 °C durante 20 min. O sobrenadante foi distribuído por 3 poços (200 µl/poço) de uma microplaca de 96

poços de fundo redondo (Nunc) e a DO foi determinada a 570 nm num espectrofotómetro (MRX<sub>II</sub>, Dinex). A média dos valores obtidos para o controlo negativo foi subtraída à média dos valores obtidos para as amostras de cultura.

#### *Determinação das unidades formadoras de colónias (UFC)*

As UFC foram determinadas de acordo com o descrito por Rodwell e Whitcomb (1983), servindo para verificar a quantidade de micoplasmas viáveis presentes na cultura. Brevemente, fizeram-se 7 diluições seriadas de base 10 em meio de Hayflick, a partir da cultura, seguindo-se a inoculação de 4 gotas de 25 µl, da diluição escolhida, em placas de meio de Hayflick sólido (em triplicado). Após a secagem das placas, à temperatura ambiente, as mesmas foram incubadas invertidas a 37 °C. A contagem das colónias realizou-se à lupa (WILD 376788) após 6 dias de incubação. O número de UFC foi obtido por aplicação da fórmula “UFC/ml = 10n × d”, em que “n” corresponde à média das colónias contadas nas 3 placas da diluição mais elevada e “d” ao factor de diluição da cultura.

#### *Armazenamento de alíquotas de cultura*

Para preparar um novo lote da estirpe B345/93 (correspondente à 8ª passagem), centrifugaram-se 100 ml da suspensão de micoplasmas na fase exponencial (48 h) a 36 000 ×g (Kubota 7930, rotor AG508R), durante 1 h a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento num volume final de 50 ml de meio Hayflick. Utilizou-se uma agulha 27G para homogenizar a suspensão e desagregar os micoplasmas. A mistura foi guardada em alíquotas de 6 ml a -80 °C.

### **III.2.3. Cultura de células EBL**

#### *Linha celular*

As células epiteliais de pulmão de embrião bovino (EBL) foram o modelo celular eucariota seleccionado para este trabalho uma vez que, aparentemente, apresentam na sua membrana plasmática receptores semelhantes aos presentes nas células do aparelho pulmonar dos bovinos, alvo principal das infecções por *MmmSC*. As células EBL utilizadas (DSMZ ACC192) correspondiam à 5ª passagem e estavam criopreservadas em azoto líquido, em alíquotas de 2×10<sup>6</sup> células/ml com 10% MEM (Meio Essencial Mínimo de Eagle, Gibco, Ref.

61100-087) suplementado com 80% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Ref. 10109-163) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, Ref. D2650).

#### *Cultura e manutenção das suspensões celulares*

O descongelamento das células EBL foi realizado em banho de água a 37 °C e o inóculo foi ressuspenso em 10 ml de meio MEM1 (10% SFB (50 ml), 2 mM de L-glutamina (5 ml), 0,1% gentamicina à concentração de 50 µg/ml (500 µl) e 445 ml de MEM, num volume final de 500 ml) a 37 °C. Seguiu-se uma centrifugação a 250 ×g, durante 5 min, e a ressuspensão do sedimento em 20 ml de MEM1. A suspensão foi distribuída por dois frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (T25, Nunc, Ref. 178891) e incubados a 37 °C, numa atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, até se verificar aproximadamente 90% de confluência dos tapetes celulares. Após alcançados 90% de confluência dos tapetes procedeu-se à sua subcultura. Para esse efeito, os tapetes foram lavados com 5 ml de PBS (130 mM de cloreto de sódio, 10 mM de fosfato de sódio, pH 7,2), e as células desagregadas por acção de 2 ml de uma solução de Tripsina Versene (0,05% tripsina, 0,02% EDTA, 0,8% NaCl, 0,04% KCl, 0,058% NaHCO<sub>3</sub> e 0,1% glucose anidra, em água destilada) a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, adicionaram-se 10 ml de MEM1 a cada frasco e recolheu-se o volume dos 2 frascos para um mesmo tubo de Falcon, que foi submetido a uma centrifugação de 300 ×g, 5 min a 20 °C. O sedimento foi ressuspenso em 5 ml de MEM1 e a viabilidade celular foi inferida pelo método clássico de exclusão do corante azul *trypan* (*ver em baixo*). Por aplicação deste método conhece-se o número de células viáveis que existem por ml de meio, o que permite adequar a concentração celular que se pretende para cada frasco adicionando um determinado volume de meio MEM e incubando a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. As subculturas foram sucessivamente mantidas por repetição deste protocolo.

#### *Método de exclusão do corante azul trypan*

Este método fornece informação sobre a quantidade de células viáveis que existem numa suspensão. Uma alíquota da suspensão celular foi diluída numa solução de corante azul *trypan* (0,4%, Gibco, Ref. 15250-061), na proporção 1:5, e deixou-se actuar durante 5 min. O corante foi selectivamente absorvido pelas células não-viáveis. De seguida, procedeu-se à contagem das células numa câmara de Neubauer (volume de 10<sup>-4</sup> ml) através da observação ao microscópio óptico invertido (Olympus CK2). A quantidade de células viáveis (não coradas) foi determinada por subtracção do número de células não-viáveis (coradas de azul). A concentração de células viáveis foi calculada pela aplicação da seguinte fórmula:  $X \times D \times C \times$

V (em que “X” representa a média de células contadas nos 4 quadrados dos extremos da câmara de Neubauer, “D” é o factor de diluição da amostra, “C” é o factor da câmara ( $10^4$ ) e “V” diz respeito ao volume da suspensão celular).

#### *Armazenamento de alíquotas de células EBL*

Após sucessivas passagens, o armazenamento das alíquotas de células EBL foi realizado à 8ª passagem, utilizando uma suspensão celular de  $2 \times 10^7$  células viáveis/ml. Para este efeito, as células recém-tripsinizadas foram centrifugadas a  $300 \times g$  durante 5 min a  $4^\circ\text{C}$  e o sedimento ressuspenso em meio de criopreservação (10% MEM, 10% DMSO, 80% SFB). A suspensão foi distribuída por criotubos, em alíquotas de 1 ml, e mantidas a  $-80^\circ\text{C}$  durante 24 h antes de serem transferidas para azoto líquido.

### **III.2.4. Experiências de citoaderência**

#### *Preparação da suspensão de MmmSC*

Para as experiências de citoaderência, utilizou-se uma das alíquotas de 6 ml, conservada a  $-80^\circ\text{C}$ , da estirpe B345/93 (8ª passagem), preparadas anteriormente. As alíquotas foram descongeladas a  $37^\circ\text{C}$  durante 2 h e, no final desse período, realizou-se uma centrifugação de 1 h a  $14\,000 \times g$ , a  $4^\circ\text{C}$ . O sedimento foi ressuspenso em 2,8 ml de meio MEM, suplementado com 2 mM de L-glutamina, e homogenizado por passagens sucessivas com uma agulha de 27G. Avaliaram-se os parâmetros de DO e UFC em meio MEM, seguindo os mesmos procedimentos já atrás descritos. A capacidade de redução de MTT dos micoplasmas foi também testada, mas com uma ligeira alteração ao protocolo anteriormente descrito. Ou seja, após o período de incubação de 45 min a  $37^\circ\text{C}$ , foram adicionados 700  $\mu\text{l}$  de HCl 0,04 N, agitou-se a suspensão e incubou-se 20 min à temperatura ambiente. A solução foi lida por espectrofotometria a 570 nm.

#### *Preparação da suspensão de células EBL*

As células EBL foram subcultivadas em frascos de  $175\text{ cm}^2$  a partir da suspensão correspondente à 8ª passagem, e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  numa atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Após o tapete celular ter atingido 90% de confluência, procedeu-se à respectiva lavagem do tapete com 10 ml de MEM2 (sem soro e sem gentamicina) e tripsinização com 7 ml de Tripsina Versene durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . As células tripsinizadas foram diluídas em 23 ml de MEM2



e recolhidas para um tubo de Falcon de 50 ml, para uma posterior centrifugação a 300 ×g, 10 min a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 20 ml de MEM2, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. Procedeu-se à contagem das células viáveis através do método de exclusão do corante azul *trypan*, descrito atrás, obtendo-se aproximadamente  $5,5 \times 10^7$  células viáveis/ml. Um volume de 1 ml de suspensão celular foi retirado e diluído em 5,5 ml de MEM2, de forma a obter-se uma suspensão com cerca de  $1 \times 10^7$  células viáveis/ml. Realizou-se uma centrifugação a 300 ×g durante 5 min, a 4 °C, e a dissolução do sedimento em 1 ml de MEM2.

#### *Infecção das células EBL com MmmSC*

Distribuíram-se 100 µl da suspensão de células EBL, com  $1 \times 10^7$  células viáveis/ml, por tubos de poliestireno (Falcon BD, 352052), aos quais foi adicionado igual volume da suspensão de micoplasmas ( $3 \times 10^9$  UFC/ml) homogenizada previamente no vórtex. As amostras foram incubadas em banho de água a 37 °C, com agitação constante (75 batidas/min) durante 1 h, promovendo a adesão de *MmmSC* às células EBL. Foram também realizadas experiências de citoaderência utilizando a suspensão de micoplasmas diluída 1:10. Os controlos negativos foram realizados por substituição da suspensão de micoplasmas por meio MEM2.

#### *Fixação*

Após os procedimentos de aderência, as células EBL com micoplasmas aderidos foram lavadas três vezes com 2 ml de PBS, a 200 ×g durante 5 min, a 4 °C, para remover os micoplasmas não aderentes. Adicionaram-se 300 µl de PBS e igual volume de paraformaldeído (PAF) a 8% (p/v) aos sedimentos celulares. A suspensão foi assim conservada a 4 °C durante a noite. Após fixação, realizou-se uma centrifugação a 1 000 ×g durante 10 min, a 4 °C, e os sedimentos celulares foram lavados com 500 µl de PBS, respeitando as mesmas condições de centrifugação anteriores. As células fixadas foram ressuspensas em 1 ml de solução PBS - etanol absoluto (1:1) e mantidas a -20 °C.

### **III.2.5. Hibridação *in situ* com sondas de DNA fluorescentes**

Vinte microlitros da suspensão celular fixada foram colocados sobre uma lâmina de vidro silanizada e, após secagem a 37 °C, o sedimento foi coberto com 40 µl de tampão de hibridação (0,9 M NaCl, 0,01% p/v SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 7,2, 20% formamida)

suplementado com 3 µl de solução de ambas as sondas EUK516 (3,0 ng/µl) e EUB338 (1,5 ng/µl), marcadas com fluoresceína e Cy3, respectivamente. A sonda EUK516 (5'-ACC AGA CTT GCC CTC C-3') liga-se especificamente ao 26S rRNA de organismos eucariotas e a EUB338 (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3') ao 16S rRNA de bactérias (Amann *et al.*, 1990). Seguiu-se um período de incubação de 1h 30 min a 43 °C em câmara húmida, permitindo a entrada das sondas nas células e a sua hibridação com as respectivas sequências de rRNA complementares. Sucedeu-se um passo de lavagem por imersão das lâminas, durante 20 min, em 50 ml de tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,01% p/v SDS, 5 mM EDTA, 225 mM NaCl) pré-aquecido a 43 °C. Seguidamente, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após secagem, os sedimentos nas lâminas foram cobertos com a solução *Prolong Gold* (Molecular Probes) e visualizadas num microscópio de epifluorescência (Olympus BX60) equipado com filtros para os fluorocromos fluoresceína e Cy3. As experiências de hibridação *in situ* foram repetidas em dias diferentes e, para cada uma delas, os ensaios foram realizados em triplicado. O controlo negativo foi realizado nas mesmas condições mas na ausência de sondas no tampão de hibridação. Para a análise quantitativa das reacções FISH, foram observados 50 a 70 campos para cada lâmina (não sobreponíveis; ampliação de 1000×), no microscópio de epifluorescência, tomando o cuidado de verificar a presença de micoplasmas fluorescentes em diferentes planos de focagem (verificando-se, no total, entre 200 a 500 células EBL em cada lâmina). O número total de células EBL (A), de micoplasmas (B) e de células EBL com pelo menos um micoplasma aderente (C) foi determinado para cada lâmina. Com base nestes valores, determinaram-se em seguida dois índices de aderência: a percentagem de células EBL com *MmmSC* aderentes ( $\%EBL^* = 100 \times C/A$ ) e o número médio de *MmmSC* por célula EBL com micoplasmas aderentes ( $MmmSC/EBL^* = B/C$ ).

Adicionalmente, amostras das linhas celulares DH82 e Vero contaminadas com micoplasmas, submetidas ao nosso laboratório para controlo de qualidade, foram fixadas em lâminas de vidro e sujeitas a experiências de FISH como descrito em cima.

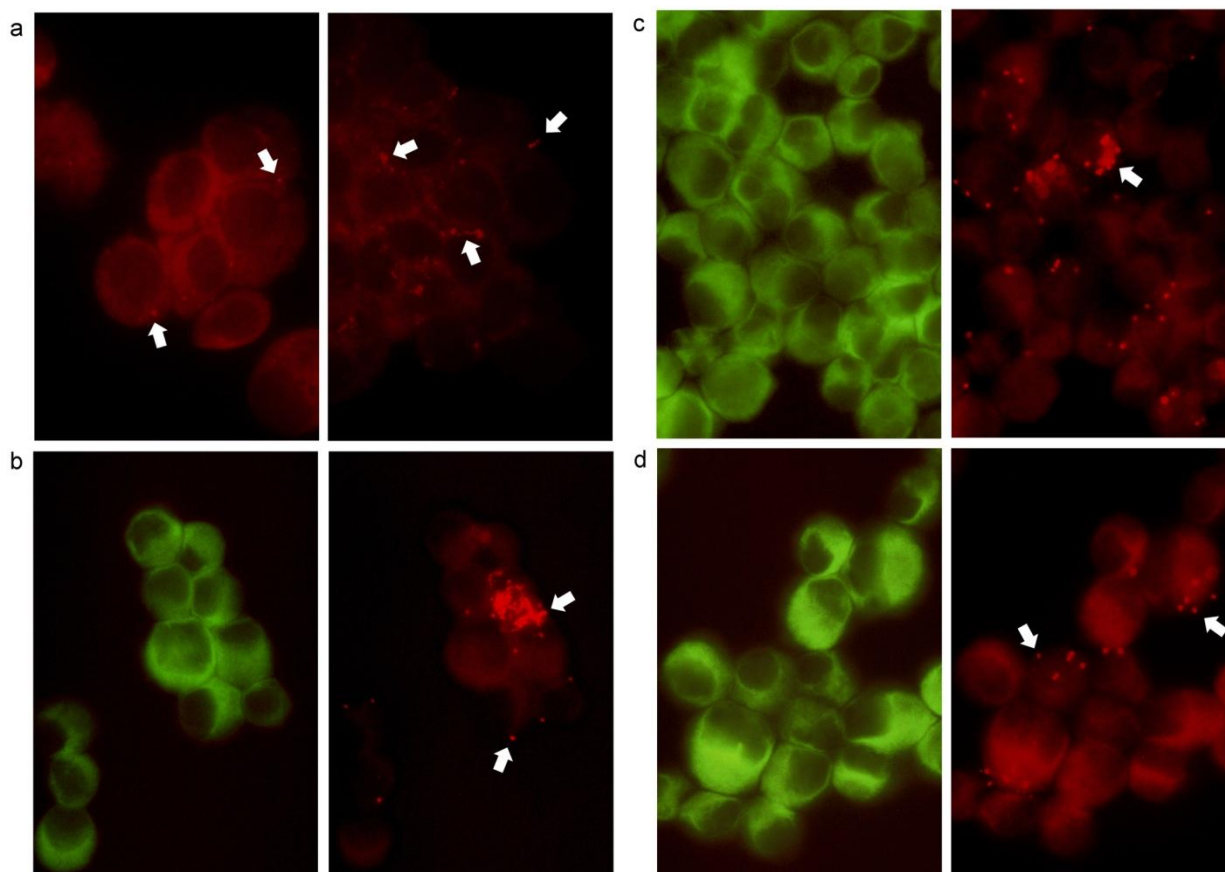
### III.3. Resultados e discussão

Já foi demonstrado *in vitro* que a estirpe B345/93 adere às células epiteliais EBL e que as moléculas dos micoplasmas implicadas nesse processo de citoaderência, parecendo ser maioritariamente de origem proteica, poderão ser promissoras para o desenvolvimento de vacinas contra a PPCB (Carvalho, 2008). Esse trabalho foi desenvolvido no LNIV no âmbito de um projecto que aí tem vindo a ser desenvolvido, no sentido de se estudar a natureza das moléculas envolvidas no processo de aderência de *MmmSC* às células epiteliais do pulmão de bovino. A metodologia seguida nesses estudos tem sido baseada na revelação da citoaderência por imunofluorescência indirecta e avaliação por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência. No entanto, esses métodos são demorados e laboriosos. Assim, no presente trabalho, pretendeu-se desenvolver e otimizar a técnica FISH para visualizar a aderência da estirpe B345/93 às células EBL. Para que se pudesse obter resultados reprodutíveis, todas as experiências de citoaderência foram realizadas a partir do mesmo lote da referida estirpe de *MmmSC*. Também houve o cuidado de se efectuar a contagem do número de UFC contidas nas suspensões de micoplasmas, assim como avaliar a actividade metabólica dos respectivos micoplasmas através do teste de redução dos sais de tetrazólio. Verificou-se, assim, que os micoplasmas estavam metabolicamente muito activos, pois está descrito que a capacidade de aderência de algumas espécies de micoplasmas está directamente associada à sua actividade metabólica (Bischof *et al.*, 2008).

Na avaliação da curva de crescimento da estirpe B345/93 (7ª Passagem) de *MmmSC* verificou-se que os valores de DO aumentaram continuamente ao longo de 72 horas. Por outro lado, o valor mais elevado para o teste de redução do MTT ocorreu às 48 horas, inferindo-se que a fase exponencial de crescimento desta estirpe se sucedeu entre o período de incubação de 24 a 48 horas. Em relação à contagem de UFC, o seu número aumentou entre as 24 e as 48 horas. Estes testes permitiram determinar o melhor ponto da curva de crescimento da estirpe B345/93 (ao fim de 48 h), em que a mesma deveria ser recolhida para as experiências de citoaderência que se seguiram.

Os resultados obtidos nas experiências de FISH encontram-se ilustrados na Figura 3.2. Foi observada uma grande heterogeneidade na distribuição do número de *MmmSC* sobre a superfície das células EBL (Figura 3.2 b, c, d). Verificou-se que a maioria das células EBL tinham poucos micoplasmas aderidos, algumas células EBL não tinham quaisquer

micoplasmas associados e só, excepcionalmente, algumas estão abundantemente colonizadas. Esta heterogeneidade na adesão dos micoplasmas a modelos celulares já tinha sido anteriormente observada em estudos de citoaderência com *Mycoplasma bovis* (Thomas *et al.*, 2003b).



**Figura 3.2.** Exemplos de fotografias das experiências de FISH para a visualização de micoplasmas aderidos a células eucariotas: **(a)** células DH82 (*esquerda*) e Vero (*direita*) naturalmente contaminadas com micoplasmas, hibridadas com a sonda EUB338 e observadas ao microscópio de epifluorescência com um filtro para o fluorocromo Cy3; **(b, c, d)** células EBL apresentando células de *MmmSC* aderentes marcadas com as sondas EUK516 e EUB338, respectivamente – mostram-se duas fotografias do mesmo campo do microscópio usando filtros para os fluorocromos fluoresceína (*esquerda*) e Cy3 (*direita*). Os micoplasmas correspondem aos pontos laranja-vivo (setas brancas).

Nos ensaios de aderência em que se utilizou uma multiplicidade de infecção (MOI) de cerca de 300 micoplasmas por célula EBL, determinou-se a percentagem de células EBL com *MmmSC* aderentes (%EBL\*) e o número médio de *MmmSC* por célula EBL com

micoplasmas aderentes (%*MmmSC*/EBL\*), originando os respectivos valores: 60% (desvio padrão 10,3%) e 2,3 (desvio padrão 0,3). Para o ensaio de aderência com a suspensão de micoplasmas diluída 10 vezes, correspondendo a uma MOI de cerca de 30 micoplasmas por célula EBL, obteve-se uma %EBL\* de 10% (desvio padrão 1,6%) e um *MmmSC*/EBL\* de 1,4 (desvio padrão 0,2).

As experiências de optimização de FISH para a detecção de micoplasmas sugerem assim que esta técnica poderá ser útil em ensaios de citoaderência futuros, nomeadamente em estudos de inibição da aderência em que as células bacterianas são previamente tratadas com anticorpos anti-adesinas ou pela incubação com moléculas análogas dos receptores. A diminuição da aderência das células assim tratadas, em relação às células controlo (não tratadas), poderá ser medida usando os índices %EBL\* e *MmmSC*/EBL\* propostos neste trabalho, permitindo a identificação de factores que participam nos processos de aderência. No entanto, para que os resultados destas experiências sejam reprodutíveis, as mesmas devem ser realizadas a partir dos mesmos lotes de suspensões de *MmmSC*, dado que as taxas de citoaderência oscilam bastante de acordo com as estirpes utilizadas, o número de passagens das mesmas, as condições experimentais, as linhas celulares eucariotas modelo e o valor de MOI (Bischof *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2003a). Por outro lado, foram utilizadas neste trabalho sondas de DNA fluorescentes universais para bactérias (EUB338) e para eucariontes (EUK516), dado que as suspensões celulares eram puras e estavam bem identificadas. No entanto, abrir-se-ão novas possibilidades experimentais quando se desenharem novas sondas FISH específicas para espécies distintas de micoplasmas, como *MmmSC* e *M. bovis*. Será assim possível delinear experiências de citoaderência competitivas entre estes dois agentes, ambos colonizadores do tracto respiratório de bovinos e, provavelmente, com as mesmas células-alvo e mecanismos de aderência semelhantes.

A técnica FISH, optimizada neste trabalho, revelou-se também útil para detectar micoplasmas contaminantes em culturas celulares eucariotas, nomeadamente em células Vero e células DH82. A contaminação com micoplasmas é um problema frequentemente associado à cultura de células. A detecção destas contaminações, no âmbito dos procedimentos de controlo de qualidade das linhas celulares, utiliza usualmente métodos baseados na cultura das bactérias, microscopia com marcação dos micoplasmas contaminantes com anticorpos fluorescentes ou corantes de DNA, microscopia electrónica de transmissão, hibridação com sondas de ácidos nucleicos e PCR (Kong *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2010; Lehmann *et al.*, 2010; Störmer *et*

*al.*, 2009). Neste trabalho, foi possível detectar a contaminação por micoplasmas nas linhas celulares DH82 e Vero usando FISH (Figura 3.2a). Ambas as linhas estavam contaminadas com *M. arginini*, determinado pela amplificação do 16S rDNA e sequenciação desta região genómica (*dados não mostrados*). A linha Vero mostrou estar muito contaminada, tal como demonstrado pelos numerosos pontos fluorescentes correspondentes à hibridação da sonda EUB338 com o 16S rRNA dos micoplasmas (Figura 3.2a). A linha DH82 encontrava-se contaminada com uma menor carga micoplasmal (Figura 3.2a). Os resultados de FISH foram confirmados pela pesquisa de micoplasmas utilizando a coloração com Hoechst 33258 (*dados não mostrados*). Deste modo, considera-se que a técnica FISH é também adequada para a detecção de micoplasmas em linhas celulares contaminadas.



### IV. Considerações finais e perspectivas de trabalho futuro

Nestas considerações finais, apresentam-se dois temas relevantes que poderão orientar trabalhos futuros nas áreas da investigação relacionadas com a PPCB e com o respectivo agente etiológico desta doença. Estas considerações tornam-se assim certamente mais úteis, sendo que ambos os temas aqui discutidos surgiram no decurso do corrente projecto e, na realidade, poderão até constituir uma continuação lógica do mesmo.

Como já atrás foi realçado, a PPCB é a doença infecciosa animal responsável pelas maiores perdas de gado no continente africano e, como tal, o efeito dessas perdas repercute-se no comércio pecuário internacional. Por outro lado, e apesar de a PPCB estar actualmente erradicada na Europa, mantém-se a necessidade de apertadas medidas de vigilância, pois trata-se de uma doença insidiosa, imprevisível e a possibilidade da sua re-emergência é uma realidade. A erradicação da PPCB foi conquistada na Europa recorrendo a medidas drásticas, envolvendo abates dos bovinos infectados, controlo das movimentações de gado e quarentena. No entanto, tal estratégia é difícil de implementar nos países africanos devido aos efeitos negativos, a curto prazo, nas suas economias já bastante débeis. A vacinação com estirpes atenuadas é, porventura, a única alternativa eficaz para o controlo da PPCB nestes países, apesar das vacinas actuais terem ainda uma eficácia bastante limitada. O desenvolvimento de testes de diagnóstico mais eficazes, de fácil utilização e baratos, capazes de detectar *MmmSC* não só nos animais sintomáticos mas também nos portadores assintomáticos, é igualmente importante para um melhor controlo da doença. O primeiro tema de investigação futura que poderá trazer algum auxílio no controlo desta doença relaciona-se justamente com a necessidade de desenvolver novos métodos de diagnóstico para a PPCB, passíveis de serem utilizados em países com menores recursos económicos. Relativamente a este tema, será de primordial importância o desenvolvimento de novos métodos moleculares de diagnóstico, pois são actualmente um dos sectores mais promissores do mercado do diagnóstico *in vitro*. Na verdade, vários métodos de diagnóstico baseados em PCR, incluindo tecnologias com resposta em tempo real, foram já descritos para a detecção de *MmmSC* e para um diagnóstico mais eficaz da PPCB a partir de amostras animais (Bashiruddin *et al.*, 2005; Gorton *et al.*, 2005; Lorenzon *et al.*, 2008; Vilei e Frey 2010). No entanto, estas tecnologias não se encontram ainda estandardizadas e requerem, normalmente, recursos humanos qualificados e instrumentação sofisticada para a sua execução. É assim necessário que os métodos



moleculares de diagnóstico se tornem mais simples, estandardizados e acessíveis para que possam ser efectivamente usados no diagnóstico de rotina de doenças animais, incluindo em laboratórios com menores recursos e nos países em vias de desenvolvimento, onde doenças como a PPCB são factores com elevada repercussão no empobrecimento das populações locais. Neste contexto, tecnologias isotérmicas de amplificação de DNA (Notomi *et al.*, 2000), como por exemplo a tecnologia LAMP (do Inglês *Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification*), combinadas com dispositivos autónomos de cromatografia lateral para a detecção dos produtos amplificados (Carter *et al.*, 2007) poderão ser adequadas para o desenvolvimento de dispositivos moleculares de diagnóstico para a PPCB, independentes da utilização de equipamentos sofisticados e, portanto, bastante mais acessíveis. Desta forma, o primeiro tema de investigação proposto nesta dissertação relaciona-se justamente com a exploração destas últimas tecnologias para o desenvolvimento de novos dispositivos de diagnóstico para esta doença.

Por outro lado, o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controlo das doenças infecciosas animais beneficia, certamente, de um conhecimento mais aprofundado dos respectivos agentes etiológicos. Neste contexto, a análise do pangenoma das espécies patogénicas de micoplasmas poderá contribuir para a descoberta de novos alvos terapêuticos e para o desenvolvimento de novos métodos de detecção e identificação mais eficazes (Marenda *et al.*, 2005; Nouvel *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2005). O pangenoma de uma espécie, ou de outro nível taxonómico, é constituído pelo “genoma indispensável” (*core genome*), composto pelos genes obrigatoriamente presentes em todas as estirpes dessa espécie ou nível taxonómico, e pelo “genoma dispensável”, correspondente aos genes que podem estar ausentes numa ou mais estirpes (Lapierre e Gogarten, 2009; Medini *et al.*, 2005). Diferentes estirpes de uma mesma espécie podem apresentar polimorfismos importantes, nomeadamente a presença ou ausência de alguns genes que poderão explicar as diferenças entre elas, quanto às suas preferências por determinados hospedeiros, tropismo tecidular, virulência e epidemiologia. Estes tipos de polimorfismos também já foram encontrados entre as estirpes de *MmmSC* de origem europeia e africana (Bischof *et al.*, 2006; Vilei *et al.*, 2000), como aliás já foi destacado atrás. Foi sugerido neste trabalho que os últimos surtos de PPCB que ocorreram em Portugal no final do século passado foram causados por, pelo menos, dois tipos moleculares de estirpes de *MmmSC* (com perfis de VNTR4 distintos). As estirpes com um perfil de VNTR4 do tipo “9” tiveram aparentemente mais sucesso, tendo conseguido dispersar-se por uma maior extensão territorial (principalmente nas regiões de Entre-Douro e

Minho) e causar mais surtos de PPCB do que as estirpes com um perfil de VNTR4 do tipo “8” (mais restritas à região de Aveiro). As primeiras estirpes, mais prevalentes, provavelmente apresentam vantagens genéticas competitivas que lhes poderão ter proporcionado uma patogenicidade ou transmissibilidade acrescida entre os respectivos hospedeiros. Deste modo, o segundo tema de investigação proposto aqui relaciona-se justamente com a elucidação das potenciais vantagens competitivas das estirpes de *MmmSC* com um VNTR4 do tipo “9”, em relação às do tipo “8”, comparando-as também com as estirpes africanas (reconhecidamente mais virulentas que as estirpes europeias). Uma estratégia possível, e também à medida que as tecnologias de sequenciação de genomas se tornam cada vez mais acessíveis, envolve o estudo do pangenoma desta espécie. Para tal, será necessário seleccionar uma ou mais estirpes de *MmmSC* de cada um dos dois tipos moleculares encontrados em Portugal, sequenciar os seus genomas e realizar uma análise genómica comparativa entre os mesmos. As sequências dos genomas da estirpe tipo de *MmmSC* (PG1) e da estirpe de referência australiana (Gladysdale) estão também já disponíveis a partir de bases de dados públicas. Este tipo de estudo já foi realizado para as espécies patogénicas *M. hyopneumoniae* (Vasconcelos *et al.*, 2005) e *M. agalactiae* (Nouvel *et al.*, 2010) demonstrando que, apesar dos seus genomas reduzidos, os micoplasmas possuem uma grande plasticidade genómica e diferentes conjuntos de genes que moldam a sua diversidade e virulência. Um estudo deste género, e que é aqui proposto, não foi ainda realizado com *MmmSC*, mas poderá abrir, certamente, novas portas para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de patogenicidade deste importante agente patogénico animal e levar à descoberta de novas estratégias terapêuticas e de diagnóstico mais eficazes para o controlo da PPCB a um nível global.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- **Abdo, E.M., Nicolet, J., Frey, J., 2000.** Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7: 588 – 595.
- **Amann, R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990.** Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1919 - 1925.
- **Amann, R., Fuchs, B.M., 2008.** Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. Nat. Rev. Microbiol. 6: 339 - 348.
- **Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., 1995.** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59: 143 - 169.
- **Athamna, A., Kramer, M.R., Kahane, I., 1996.** Adherence of *Mycoplasma pneumonia* to human alveolar macrophages. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 15: 135 – 141.
- **Baranowski, E., Guiral, S., Sagné, E., Skapski, A., Citti, C., 2010.** Critical role of dispensable genes in *Mycoplasma agalactiae* interaction with mammalian cells. Infect. Immun. 78: 1542 – 1551.
- **Baseman, J.B., Tully, J.G., 1997.** Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. Emerg. Infect. Dis. 3: 21 - 32.
- **Bashiruddin, J.B., Santis, P., Persson, A., Ball, H., Regalla, J., 2005.** Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC in bovine lung and lymph node tissues by culture, sandwich ELISA and polymerase chain reaction systems. Res. Vet. Sci. 78: 199 – 205.
- **Bashiruddin, J.B., Taylor, T.K., Gould, A.R., 1994.** A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 428 - 434.

- **Behrens, S., Rühland, C., Inácio, J., Huber, H., Fonseca, Á., Spenser-Martins, I., Fuchs, B.M., Amann, R., 2003.** *In situ* accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains Bacteria, Archaea, Eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1748 – 1758.
- **Bischof, D.F., Janis, C., Vilei, E.M., Bertoni, G., Frey, J., 2008.** Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect. Immun.* 76: 263 – 269.
- **Bischof, D.F., Vilei, E.V., Frey, J., 2006.** Genomic differences between type strain PG1 and field strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. *Genomics* 88: 633 – 641.
- **Bonvin-Klotz, L., Vilei, E.M., Kühni-Boghenbor, K., Kapp, N., Frey, J., Stoffel, M.H., 2008.** Domain analysis of lipoprotein LppQ in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Antonie Leeuwenhoek* 93: 175–183.
- **Botelho, A., 2001.** Caracterização e detecção molecular de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, agente etiológico da Peripneumonia Contagiosa Bovina. Dissertação de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.
- **Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., Neviani, E. 2006.,** Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 485 – 494.
- **Boye, M., Jensen, T.K., Ahrens, P., Hagedorn-Olsen, T., Friis, N.F., 2001.** *In situ* hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *APMIS* 109: 656 - 664.
- **Bruderer, U., Regalla, J., Abdo, E.M., Huebschled, O.J.B., Frey, J., 2002.** Serodiagnosis and monitoring of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) with an indirect ELISA based on the specific lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet. Microbiol.* 84: 195 – 205.
- **Carter D.J., Cary, R.B., 2007.** Lateral flow microarrays: a novel platform for rapid nucleic acid detection based on miniaturized lateral flow chromatography. *Nucleic Acids Res.* (doi:10.1093/nar/gkm269).

- **Carvalho, C.I.C., 2008.** Estudo da inibição da aderência de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC a células epiteliais de pulmão de bovino. Dissertação de Mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal.
- **Cheng, X., Nicolet, J., Poumarat, F., Regalla, J., Thiaucourt, F., Frey, J., 1995.** Insertion element IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology* 141: 3221 – 3228.
- **Curasson, G., 1942.** Péripleumonie bovine, in: *Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée*. Vigot Frères (Ed.), Paris, France, pp. 276 – 353.
- **Dybvig, K., Voelker, L., 1996.** Molecular biology of *Mycoplasma*. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 25–57.
- **Fox, G.E., Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P., 1992.** How close is close? 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 166 – 170.
- **Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison, C.A., Venter, J.C., 1995.** The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* 270: 397 – 403.
- **Frey, J., Cheng, X., Kuhnert, P., Nicolet, J., 1995.** Identification and characterization of IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and presence in related mycoplasmas. *Gene* 160: 95 – 100.
- **Gasparich, G. E., Whicomb, R.F., Dodge, D., French, F.E., Glass, J., Williamson, D.L., 2004.** The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 893 – 918.

- **Gonçalves, R., Regalla, J., Nicolet, J., Frey, J., Nicholas, R., Bashiruddin, J., De Santis, P., Penha-Gonçalves, A.P., 1998.** Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Vet. Microbiol.* 63: 13-28.
- **Gorton, T.S., Barnett, M.M., Gull, T., French, R.A., Lu, Z., Kutish, G.F., Adams, L.G., Geary, S.J., 2005.** Development of real-time diagnostic assays specific for *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Small Colony. *Vet. Microbiol.* 111: 51 – 58.
- **Gosney, F., Corrà, M., Iob, L., McAuliffe, L., Nicholas, R.A.J., 2010.** Variable number tandem repeat (VNTR) typing of strains of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony isolated from north-eastern regions of Italy between 1990 and 1993. *Vet. Microbiol.* (doi: 10.1016/j.vetmic.2010.06.009).
- **Houshaymi, B.M., Miles, R.J., Nicholas, R.A., 1997.** Oxidation of glycerol differentiates African from European isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC (small colony). *Vet. Rec.* 140: 182 – 183.
- **Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988.** Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465 – 2466.
- **Inácio, J., Behrens, S., Fuchs, B.M., Fonseca, Á., Spencer-Martins, I., Amann, R. 2003.,** *In situ* accessibility of *Saccharomyces cerevisiae* 26S rRNA to Cy3-labeled oligonucleotide probes comprising the D1 and D2 domains. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2899 – 2905.
- **Janis, C., Bischof, D., Gourgues, G., Frey, J., Blanchard, A., Sirand-Pugnet, P., 2008.** Unmarked insertional mutagenesis in the bovine pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: characterization of a *lppQ* mutant. *Microbiology* 154: 2427 – 2436.
- **Jomantiene, R., Davis, R.E., Maas, J., Dally, E.L., 1998.** Classification of new phytoplasmas associated with diseases of strawberry in Florida, based on analysis of 16S rRNA and ribosomal protein gene operon sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 269 – 277.

- **Kong, F., James, G., Gordon, S., Zelynski, A., Gilbert, G.L., 2001.** Species-specific PCR for identification of common contaminant Mollicutes in cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3195 - 3200.
- **Krivan, H.C., Olson, L.D., Barile, M.F., Ginsburg, V., Roberts, D.D., 1989.** Adhesion of *Mycoplasma pneumonia* to sulfated glycolipids and inhibition by dextran sulfate. *J. Biol. Chem.* 264: 9283 – 9288.
- **Lapierre P., Gogarten, J.P., 2009.** Estimating the size of the bacterial pan-genome. *Trends Genet.* 25: 107 – 110.
- **Lawrence, B., Bashiri, H., Dehghani, H., 2010.** Cross comparison of rapid mycoplasma detection platforms. *Biologicals* 38: 218–223.
- **Lehman, D., Jouette, S., Olivieri, F., Laborde, S., Rofel, C., Simon, E., Metz, D., Felden, L., Ribault, S., 2010.** Novel sample preparation method for molecular detection of Mollicutes in cell culture samples. *J. Microbiol. Meth.* 80: 183-189.
- **Lin, Y.-C., Correia, I., Ferronha, M.H., Shahram, M., Miles, R., 2001.** Monitoring mycoplasma growth: A review with recent applications of tetrazolium reduction methods. In *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics* - Vol. 5. Edited by: Poveda JB, Fernandez A, Frey J and Johansson KE. Brussels, European Communities; 2001:56-59. [COST Action 826 / EUR 19693]
- **Lorenzon, S., Arzul, I., Peyraud, A., Hendrikx, P., Thiaucourt, F., 2003.** Molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia by multilocus sequence analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* biotype SC strains. *Vet. Microbiol.* 93: 319 – 333.
- **Lorenzon S., Manso-Silván, L., Thiaucourt, F., 2008.** Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol. Cel. Prob.* 22: 324 – 328.
- **Manso-Silván, L., Perrier, X., Thiaucourt, F., 2007.** Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2247 - 2258.



- **Manso-Silván, L., Vilei, E.M., Sachse, K., Djordjevic, S.P., Thiaucourt, F., Frey, J., 2009.** *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 1353 – 1358.
- **March, J.B., 2004.** Improved formulations for existing CBPP vaccines-recommendations for change. Vaccine 22: 4358- 4364.
- **Marenda M.S., Sagné, E., Poumarat, F., Citti, C., 2005.** Suppression subtractive hybridization as a basis to assess *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* genomic diversity and species-specific sequences. Microbiology 151: 475 – 489.
- **McAuliffe, L., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., 2007.** Identification and characterization of variable-number tandem repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. FEMS Microbiol. Lett. 276: 181 – 188.
- **McAuliffe, L., Churchward, C.P., Lawes, J.R., Loria, G., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., 2008.** VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. BMC Microbiol. 8: 193.
- **Medini D., Donati, C., Tettelin, H., Massignani, V., Rappuoli, R., 2005.** The microbial pan-genome. Curr. Opin. Genet. Dev. 15: 589 – 594.
- **Miles, R.J., 1992.** Catabolism in mollicutes. J. Gen. Microbiol. 138: 1773-1783.
- **Miserez, R., Pilloud, T., Cheng, X., Nicolet, J., Griot, C., Frey, J., 1997.** Development of a sensitive nested PCR method for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Mol. Cel. Prob. 11: 103 – 111.
- **Miyata, M., Seto, S., 1999.** Cell reproduction cycle of mycoplasma. Biochimie 81: 873 – 878.
- **Monnerat, M.P., Thiaucourt, F., Poveda, J.B., Nicolet, J., Frey, J., 1999.** Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp *capri*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 6: 224 – 230.

- **Moter, A., Göbel, U.B., 2000.** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Meth. 41: 85 – 112.
- **Nicholas, R.A.J., Bashiruddin, J.B., 1995.** *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (small colony variant): the agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the *Mycoplasma mycoides* cluster. J. Comp. Pathol. 113: 1 – 27.
- **Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T., 2000.** Loop mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 28: e63.
- **Nouvel, L.X., Sirand-Pugnet, P., Marends, M.S., Sagné, E., Barbe, V., Mangenot, S., Schenowitz, C., Jacob, D., Barré, A., Claverol, S., Blanchard, A., Citti, C., 2010.** Comparative genomic and proteomic analyses of two *Mycoplasma agalactiae* strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. BMC Genomics 11: 86.
- **Oshima, K., Nishida, H., 2007.** Phylogenetic relationships among mycoplasmas based on the whole genomic information. J. Mol. Evol. 65: 249 – 258.
- **Persson, A., Jacobsson, K., Frykberg, L., Johansson, K.E., Poumarat, F., 2002.** Variable surface protein Vmm of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. J. Bacteriol. 184: 3712 – 3722.
- **Pilo, P., Frey, J., Vilei, E.M., 2007.** Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Vet. J. 174: 513 – 521.
- **Pilo, P., Martig, S., Frey, J., Vilei, E.M., 2003.** Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein LppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Vet. Res. 34: 761 – 775.
- **Pilo, P., Vilei, E.M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M.H., Dobbelaere, D., Frey, J., 2005.** A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. J. Bacteriol. 187: 6824 – 6831.
- **Poumarat, F., Solsona, M., 1995.** Molecular epidemiology of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* biotype small colony, the agent of contagious bovine pleuropneumonia. Vet. Microbiol. 47: 305 – 315.

- **Razin, S., Yogev, D., Naot, Y., 1998.** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1094 – 1156.
- **Regalla, J., 1984.** Epidemiological aspects of contagious bovine pleuropneumonia in Portugal. *Repositório de Trabalhos do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária*, XVI, 13-18.
- **Rice, P., Houshaymia, B.M., Abu-Grouna, E.A.M., Nicholas, R.A.J., Miles, R.J., 2001.** Rapid screening of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Mycoplasma mycoides* and differentiation of European subsp. *mycoides* SC (small colony) isolates. *Vet. Microbiol.* 78: 343 – 351.
- **Rodwell, A.W., Whitcomb, R.F., 1983.** Methods for direct and indirect measurement of mycoplasma growth. In: Razin, S. & Tully, J.G. *Methods in Mycoplasmaology*. Academic Press, v.1, p. 185-196.
- **Rottem, S., 2003.** Interaction of mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* 83: 417 – 432.
- **Rottem, S., Naot, Y., 1998.** Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. *Trends Microbiol.* 6: 436.
- **Sachse, K., Pfützner, H., Heller, M., Hänel, I., 1993.** Inhibition of *Mycoplasma bovis* cytoadherence by a monoclonal antibody and various carbohydrate substances. *Vet. Microbiol.* 36: 307 – 316.
- **Shahram, M., Nicholas, R.A.J., Wood, A.P., Kelly, D.P., 2010.** Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* Large Colony type to *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. *System. Appl. Microbiol.* 33: 20 – 24.
- **Störmer, M., Vollmer, T., Henrich, B., Kleesiek, K., Dreier, J., 2009.** Broad-range real-time PCR assay for the rapid identification of cell-line contaminants and clinically important mollicute species. *Int. J. Med. Microbiol.* 299: 291-300.
- **Svenstrup, H.F., Nielsen, P.K., Drasbek, M., Birkelund, S., Christiansen, G., 2002.** Adhesion and inhibition assay of *Mycoplasma genitalium* and *M. pneumoniae* by immunofluorescence microscopy. *J. Med. Microbiol.* 51: 361–373.
- **Tardy, F., Gaurivaud, P., Tricot, A., Maigre, L., Poumarat, F., 2009.** Epidemiological surveillance of mycoplasmas belonging to the '*Mycoplasma*

*mycoides*' cluster: is DGGE fingerprinting of 16S rRNA genes suitable? Lett Appl Microbiol. 48: 210 - 217.

- **Thiaucourt, F., Lorenzon, S., David, A., Tulasne, J.J., Domenech, J., 1998.** Vaccination against contagious bovine pleuropneumonia and the use of molecular tools in epidemiology. Ann. NY Acad. Sci. 849: 146 – 151.
- **Thiaucourt, F., Van Der Lugt, J.J., Provost, A., 2004.** Contagious bovine pleuropneumonia. In J.A.W. Coetzer & R.C. Tustin (Eds), Infectious Diseases of Livestock. (2nd ed.). (pp. 2045-2059). South Africa: Oxford University Press Southern Africa.
- **Thomas, A., Sachse, K., Dizier, I., Grajetzki, C., Farnir, F., Mainil, J.G., Linden, A., 2003a.** Adherence to various host cell lines of *Mycoplasma bovis* strains differing in pathogenic and cultural features. Vet. Microbiol. 91: 101-113.
- **Thomas, A., Sachse, K., Farnir, F., Dizier, I., Mainil, J., Linden, A., 2003b.** Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. Microbiol. Path. 34: 141-148.
- **Ueno, P.M., Timenetsky, J., Centonze, V.E., 2008.** Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization. Microbiology 154: 3033 – 3041.
- **Varela, F., Inácio, J., Botelho, A., 2010.** Molecular diversity assessed by VNTR and IS1296 typing of historical *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC strains. Vet. Microbiol. (doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.030).
- **Vasconcelos A.T, Ferreira, H.B., Bizarro, C.V., et al., 2005.** Swine and poultry pathogens: the complete genome sequences of two strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a strain of *Mycoplasma synoviae*. J. Bacteriol. 187: 5568 - 5577.
- **Vilei, E.M., Abdo, E.M., Nicolet, J., Botelho, A., Gonçalves, R., Frey, J., 2000.** Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. Microbiology 146: 477 – 486.
- **Vilei, E.M., Correia, I., Ferronha, M.H., Bischof, D.F., Frey, J., 2007.**  $\beta$ -D-glucoside utilization by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: possible

involvement in the control of cytotoxicity towards bovine lung cells. BMC Microbiol. 7: 31 (doi:10.1186/1471-2180-7-31).

- **Vilei, E.M., Frey, J., 2001.** Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8: 85 – 92.
- **Vilei E.M., Frey, J., 2010.** Detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC in bronchoalveolar lavage fluids of cows based on a *TaqMan* real-time PCR discriminating wild type strains from an *lppQ*– mutant vaccine strain used for DIVA-strategies. J. Microbiol. Met. 81: 211 – 218.
- **Vilei, E.M., Nicolet, J., Frey, J., 1999.** IS1634, a novel insertion element creating long, variable-length direct repeats which is specific for *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small-colony type. J. Bacteriol. 181: 1319 – 1323.
- **Yaya, A., Manso-Silván, L., Blanchard, A., Thiaucourt, F., 2008.** Genotyping of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by multilocus sequence analysis allows molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia. Vet. Res. 39: 14.
- **Washburn, L.R., Bird, D.W., Dybvig, K., 2003.** Restoration of cytoadherence to an adherence-deficient mutant of *Mycoplasma arthritidis* by genetic complementation. Infect. Immun. 71: 671 – 675.
- **Westberg, J., Persson, A., Holmberg, A., Goesmann, A., Lundeberg, J., Johansson, K. E., Pettersson, B., Uhlén, M. 2004.,** The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1<sup>T</sup>, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). Gen. Res. 14: 221 – 227.

**MEIO DE CULTURA HAYFLICK LÍQUIDO***(Método de preparação usado no LNIV)*

PRODUTOS	REFERÊNCIA (fabricante)	QUANTIDADE (para 1 L)
PPLO Broth	BD255420	21 g
Tryptose	BD211713	10 g
Glucose	Merck108337	1 g
Extracto de levedura	BD212750	10 g
Água destilada		700 ml
SUPLEMENTOS		
Soro de cavalo inativado a 56 °C, 30 min		20 ml
Penicilina G		0,25 ml

**PROCEDIMENTO**

1. Pesar os reagentes PPLO Broth, triptose, glucose e extracto de levedura, e dissolver em 700 ml de água destilada;
2. Dissolver completamente por agitação magnética e aquecimento a 80 °C;
3. Acertar o pH para valores  $7,8 \pm 0,2$  com uma solução stock de NaOH, se necessário;
4. Deixar arrefecer a solução até 20 °C;
5. Adicionar os suplementos e esterilizar por filtração;
6. Distribuir 5 ml de meio por tubos.

## MEIO DE CULTURA HAYFLICK SÓLIDO

(Método de preparação usado no LNIV)

PRODUTOS	REFERÊNCIA (fabricante)	QUANTIDADE (para 1 L)
PPLO Broth	BD241210	35 g
Tryptose	BD211713	10 g
Glucose	Merck108337	1 g
Água destilada		700 ml
SUPLEMENTOS		
Soro de cavalo inactivado a 56 °C, 30 min		20 ml
Penicilina G		0,25 ml

### PROCEDIMENTO

1. Pesar os reagentes PPLO Broth, triptose, glucose e extracto de levedura e dissolver em 700 ml de água destilada;
2. Dissolver completamente por agitação magnética e aquecimento a 80 °C;
3. Acertar o pH para valores  $7,8 \pm 0,2$  com uma solução stock de NaOH, se necessário;
4. Esterilizar no autoclave a 115 °C durante 30 min;
5. Deixar arrefecer utilizando um banho de água a 56 °C;
6. Adicionar os suplementos e esterilizar por filtração;
7. Distribuir 9 ml de meio por placa de Petri.

## MEIOS DAS PROVAS BIOQUÍMICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS

(Métodos de preparação usados no LNIV)

REAGENTES	HIDRÓLISE DA GLUCOSE (a 50%)	HIDRÓLISE DA ARGININA (a 30%)	HIDRÓLISE DA UREIA (a 40%)	REDUÇÃO DO TETRAZÓLIO (a 2%)	PESQUISA DA FOSFATASE (a 1%)
<i>Heart Infusion</i> <i>Broth</i> esterilizado	180 ml	180 ml	180 ml	180 ml	148 ml
Soro de cavalo inativado	40 ml	40 ml	40 ml	40 ml	40 ml
Extracto de levedura a 25%	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	10 ml
DNA a 2%	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	-
Reagente analítico da prova*	2 ml	8,5 ml	2,5 ml	5 ml	2 ml
Vermelho de fenol a 0,06%	5 ml	5 ml	5 ml	-	-
Penicilina	-	-	-	-	400 UI/ml
pH	7,8	7,3	7,3	7,5	7,8

\* Reagente analítico de prova diz respeito ao reagente principal de cada prova bioquímica, ou seja, glucose (50 ml água destilada/25 g de glucose), arginina (50 ml água destilada/15 g de cloridrato de arginina monoclorídrica), ureia (50 ml água destilada/20 g de ureia), tetrazólio (50 ml água destilada/1 g de cloridrato de trifeniltetrazólio) e fosfatase (50 ml água destilada/2 g de difosfato de fenolftaleína de sódio).



## CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MICOPLASMAS DE BOVINOS E DE PEQUENOS RUMINANTES

ORGANISMO	ESTIRPE TIPO	SENSIBILIDADE À DIGITONINA	GLUCOSE	ARGININA
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	PG1	+	+	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	Y- Goat	+	+	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3	+	+	-
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California Kid	+	+	+
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumonia</i>	F38	+	+	-
<i>M. bovoculi</i>	M165/69	+	+	-
<i>M. alvi</i>	Ilsley	+	+	+
<i>M. dispar</i>	462/2	+	+	-
<i>M. bovis</i>	PG45	+	-	-
<i>M. bovigenitalium</i>	PG11	+	+	+
<i>M. alkalescens</i>	PG51	+	-	+
<i>M. canadense</i>	275C	+	-	+
<i>M. veredundum</i>	107	+	-	-
<i>M. conjunctivae</i>	HRC581	+	+	-
<i>M. ovipneumonia</i>	Y98	+	+	-
<i>M. putrefaciens</i>	KS1	+	+	+/-
<i>M. agalactiae</i>	PG2	+	-	-
<i>M. arginini</i>	G230	+	-	+
<i>M. bovirhinis</i>	QEW	+	+	-
<i>A. laidlawii</i>	PG8	-	+	-

ORGANISMO	ESTIRPE TIPO	TETRAZÓLIO	FOSFATASE	“FILM & SPOTS”	DIGESTÃO DA CASEÍNA
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> SC	PG1	+	-	-	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> LC	Y- Goat	+	-	-	+
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3	+	-	-	+
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California Kid	+	-	-	+
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumonia</i>	F38	-	-	-	+
<i>M. bovoculi</i>	M165/69	+	-	-	-
<i>M. alvi</i>	Ilsley	-	-	-	-
<i>M. dispar</i>	462/2	+	-	+/-	-
<i>M. bovis</i>	PG45	+	+	+	-
<i>M. bovigenitalium</i>	PG11	+/-	-	+	-
<i>M. alkalescens</i>	PG51	-	+	-	-
<i>M. canadense</i>	275C	-	-	-	-
<i>M. veredundum</i>	107	-	-	+	-
<i>M. conjunctivae</i>	HRC581	+	-	-	-
<i>M. ovipneumonia</i>	Y98	+	-	-	-
<i>M. putrefaciens</i>	KS1	+	+	+	-
<i>M. agalactiae</i>	PG2	+	+	+	-
<i>M. arginini</i>	G230	-	-	-	-
<i>M. bovirhinis</i>	QEW	+	-	-	-
<i>A. laidlawii</i>	PG8	+	-	-	-